

С. Н. Толиков, В. И. Розенгарт

ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
и  
АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ  
ВЕЩЕСТВА



С.А.Толстой

ХОЛИНЭСТЕ  
и  
АНТИХОЛИНЭ  
ВЕЩЕСТВЕ

Дорог

10/хп 69

ИЗДАТЕЛЬСТ  
ЛЕНИНГРАДСКО



С. Н. Голиков, В. И. Розенгарт

ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
и  
АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ  
ВЕЩЕСТВА

Дорогому Григорию  
Андреевичу  
от авторов

Р. М. Мещеряков  
10/XII 64 г. В. И. Розенгарт

ИЗДАТЕЛЬСТВО „МЕДИЦИНА“  
Ленинградское отделение 1964



Издание предназначено для биохимиков, фармакологов, токсикологов, а также практических врачей.

В книге изложены современные представления о физиологической роли и свойствах холинэстеразы, фермента, непосредственно связанного с основными процессами нервной деятельности, а также о химических и фармакологических свойствах веществ, подавляющих активность этого фермента. Подробно изложены данные о распространении холинэстеразы, строении ее активной поверхности, методах определения ее активности и способах получения очищенных препаратов фермента.

Приведены подробные сведения о химических, биохимических и фармакологических свойствах этих веществ, механизме их токсического действия и о путях профилактики и терапии интоксикации этими веществами.

Отзывы просим направлять по адресу: Ленинград, Д-104, ул. Некрасова, 10, Ленинградское отделение издательства «Медицина»

Издание книги рекомендовано редакционно-издательским советом Академии медицинских наук СССР



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
-----------------------	---

### ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

Холинэстеразы . . . . .	5
Общие представления о механизме передачи нервных импульсов в синапсах и роль холинэстеразы . . . . .	—
Общие свойства холинэстераз . . . . .	12
Открытие, номенклатура и классификация холинэстераз . . . . .	15
Распространение холинэстераз . . . . .	22
Субстратная специфичность . . . . .	28
Каталитическая эффективность . . . . .	31
Строение активной поверхности холинэстеразы и механизм гидролиза ацетилхолина . . . . .	32
Двойственная природа активной поверхности холинэстеразы . . . . .	39
Гидролиз ацетилхолина . . . . .	41
Эстеразный центр . . . . .	43
Участие имидазола в эстеразном центре . . . . .	47
Участие серина в эстеразном центре . . . . .	51
Объединенная схема эстеразного катализа . . . . .	56
Участие фенольных и других групп в каталитическом действии эстераз . . . . .	60
Анионный центр . . . . .	61
Методы определения и изолирования холинэстераз . . . . .	—
Методы определения активности холинэстеразы . . . . .	65
Очистка холинэстеразы . . . . .	65

### ЧАСТЬ ВТОРАЯ

Антихолинэстеразные вещества . . . . .	67
«Обратимые» ангибиторы холинэстеразы . . . . .	70
Четвертичные аммониевые соединения . . . . .	—
Эфиры карбаминовой кислоты . . . . .	76
Механизм действия карбаматов на холинэстеразу . . . . .	82
Другие ингибиторы . . . . .	85
Фосфорорганические соединения . . . . .	87
Открытие и значение фосфорорганических соединений . . . . .	—
Строение и общая характеристика . . . . .	89
Обзор химических свойств . . . . .	96
Фосфорилирование . . . . .	97
Гидролиз . . . . .	99
Окисление . . . . .	102
Изомеризация . . . . .	103
Самоалкилирование . . . . .	104



Действие фосфорорганических соединений на ферменты . . . . .	105
Действие на холинэстеразу . . . . .	—
Кинетика торможения холинэстеразы и способ выражения анти- холинэстеразной активности ФОС . . . . .	111
Зависимость между структурой ФОС и их антихолинэстеразной активностью . . . . .	114
Фосфорилирующая способность . . . . .	119
Способность к ориентации . . . . .	125
Значение оптической изомерии . . . . .	126
Действие на разные холинэстеразы . . . . .	—
Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС . . . . .	127
Действие на другие ферменты . . . . .	131
Реактивирование холинэстеразы, угнетенной ФОС . . . . .	—
Спонтанная реактивация . . . . .	133
Восстановление активности с помощью реактиваторов . . . . .	135
Кинетика и механизм реактивации . . . . .	136
Строение реактиваторов . . . . .	141
О гипотезе «молекулярной комплементарности» . . . . .	142
Зависимость реактивации от природы ингибитора и фермента . . . . .	143
Утрата способности к реактивации . . . . .	146
Превращения фосфорорганических соединений в организме . . . . .	—
Распределение и выведение ФОС . . . . .	149
Детоксикация ФОС . . . . .	153
Активация ФОС . . . . .	157
Фармакология антихолинэстеразных веществ . . . . .	159
Влияние антихолинэстеразных веществ на органы и системы . . . . .	—
Влияние на глаз . . . . .	163
Влияние на желудочно-кишечный тракт . . . . .	—
Влияние на пищеварительные железы . . . . .	166
Влияние на двигательную функцию желудочно-кишечного тракта . . . . .	172
Влияние на некоторые железы . . . . .	173
Влияние на сократительную деятельность матки . . . . .	175
Действие на систему дыхания . . . . .	—
Бронхоспазм . . . . .	180
Действие на дыхательный центр . . . . .	183
Влияние на хеморецепторы каротидных клубочков . . . . .	185
Влияние на дыхательную мускулатуру . . . . .	188
Действие на сердечно-сосудистую систему . . . . .	—
Изменения кровяного давления . . . . .	—
Гипотензивные эффекты . . . . .	190
Гипертензивные эффекты . . . . .	192
Действие на сердце . . . . .	194
Изменения электрокардиограммы . . . . .	197
Действие на ганглии . . . . .	200
Влияние на нервно-мышечные синапсы . . . . .	208
Антикурарное действие . . . . .	213
Мышечные параличи . . . . .	214
Влияние на нейро-эндокринную регуляцию . . . . .	215
Влияние на центральную нервную систему . . . . .	—
Проникновение через гемато-энцефалический барьер . . . . .	220
Влияние на рефлекторную деятельность спинного мозга . . . . .	221
Действие эзерина и прозерина . . . . .	222
Действие ФОС . . . . .	231
Влияние на лабиринтные рефлексы и рефлексы положения тела . . . . .	232
Влияние на электрическую активность мозга . . . . .	239
Влияние на эффекты судорожных и наркотических ядов . . . . .	240
Влияние на высшую нервную деятельность . . . . .	248
Эффекты при непосредственном введении в мозг . . . . .	251
Клиническое применение антихолинэстеразных веществ . . . . .	—



Применение в невропатологии . . . . .	252
Лечение миастении . . . . .	—
Лечение других нервных заболеваний . . . . .	254
Применение при атонии кишечника и мочевого пузыря . . . . .	257
Применение в офтальмологии . . . . .	258
Применение в акушерской практике . . . . .	263
Другие возможности клинического применения . . . . .	265
Токсикология фосфорорганических веществ . . . . .	268
Интоксикация ФОС у животных . . . . .	—
Симптомы отравления . . . . .	269
Ингаляционное отравление . . . . .	270
Накожная аппликация . . . . .	271
Отравление при попадании яда в желудок . . . . .	273
Зависимость токсичности от химического строения ФОС . . . . .	—
Хроническая интоксикация . . . . .	275
Видовая чувствительность животных к ФОС . . . . .	277
Половые различия в чувствительности к ФОС . . . . .	278
Влияние возраста на токсичность . . . . .	—
Влияние некоторых факторов внешней среды на токсичность ФОС . . . . .	279
Усиление токсичности ФОС при совместном применении . . . . .	—
Токсичность при повторных введениях . . . . .	280
Явления адаптации . . . . .	281
Биохимические изменения при отравлении ФОС . . . . .	282
Угнетение холинэстеразы . . . . .	—
Другие изменения . . . . .	286
Патоморфологические изменения . . . . .	288
Общие представления о механизме действия ФОС . . . . .	290
Экспериментальная терапия отравлений ФОС . . . . .	299
Блокирование холинореактивных систем . . . . .	300
Комбинирование холинолитических веществ . . . . .	302
Комбинирование атропина с курареподобными веществами . . . . .	—
Комбинирование атропина с сернокислой магнезией . . . . .	309
Комбинирование атропина с ганглиоблокаторами . . . . .	310
Комбинирование атропина с М-холинолитиками . . . . .	311
Комбинирование атропина с местноанестезирующими веществами . . . . .	312
Реактивирование холинэстеразы . . . . .	—
Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС . . . . .	321
Ускорение гидролиза ФОС . . . . .	323
Подавление синтеза ацетилхолина . . . . .	324
Возмещение холинэстеразы . . . . .	325
Другие виды патогенетической терапии . . . . .	326
Клиника, диагностика и терапия отравлений людей ФОС . . . . .	328
Клиническая картина интоксикации ФОС . . . . .	329
Острое отравление . . . . .	—
Хроническая интоксикация . . . . .	334
Лечение отравлений ФОС . . . . .	336
Прекращение дальнейшего поступления яда в организм . . . . .	—
Антидотная терапия . . . . .	—
Атропинизация . . . . .	—
Применение реактиваторов холинэстеразы . . . . .	339
Искусственное дыхание . . . . .	341
Литература . . . . .	343
Указатель препаратов . . . . .	373



## ПРЕДИСЛОВИЕ

Вопросы, связанные с исследованием свойств холинэстеразы и антихолинэстеразных веществ, уже в течение многих лет заслуженно привлекают к себе внимание специалистов самого различного профиля. Это легко объяснить двумя обстоятельствами.

Во-первых, холинэстераза относится к числу ферментов, играющих центральную роль в обеспечении специфической функциональной активности нервной системы — в частности, в синаптической передаче. Это определяет интерес к ней со стороны теоретиков (биохимиков, физиологов, фармакологов), поскольку изучение биохимических и физиологических свойств холинэстеразы позволяет приблизиться к пониманию молекулярных процессов, лежащих в основе нервной деятельности.

Во-вторых, известно огромное число (и оно непрерывно растет) химических соединений, способных подавлять активность холинэстеразы.

Большинство этих соединений обладает выраженной физиологической активностью, в связи с чем многие из них получили широкое применение в медицине и биологии. Кроме того, антихолинэстеразные вещества широко применяются в качестве инсектицидов для борьбы с вредителями сельского хозяйства; не менее важно использование некоторых из них (особенно фосфорорганических соединений) в ряде технологических процессов.

Отсюда понятен тот интерес, который проявляют к этой проблеме химики, энтомологи, ботаники, почвоведы, ветеринары и практические работники сельского хозяйства.

Но для нас наиболее важно то значение, которое эти вопросы имеют для врачей различных специальностей. Это значение определяется, с одной стороны, чрезвычайно широким и все более расширяющимся контактом большого числа людей с физиологически активными, а нередко и токсичными антихолинэстеразными соединениями в процессе их изготовления и практического использования, а с другой стороны — возможностью применения их в качестве лекарственных средств и уже отме-



ченным выше интересом, который они представляют с теоретической точки зрения.

Число публикаций, посвященных экспериментальному исследованию холинэстеразы и антихолинэстеразных веществ, неуклонно растет и к настоящему времени составляет около 10 000. Совершенно очевидно, что даже специалисту, непосредственно работающему в данной области, нелегко разобраться в этом потоке сообщений. Обобщающие работы (обзоры и монографии), которые время от времени выходят за рубежом, не могут удовлетворить советского читателя, потому что они совершенно не отражают обширные исследования, проводимые во многих химических, биохимических, фармакологических и других лабораториях Советского Союза, результаты которых постоянно публикуются в советской научной периодике и в отдельных сборниках.

В то же время обзоры и обобщения, созданные отечественными авторами, чрезвычайно ограничены как по числу, так и по объему. Все они посвящены более или менее частным вопросам и не дают суммированного представления о свойствах холинэстеразы и антихолинэстеразных веществ. Из книг можно назвать лишь две: это монография М. Я. Михельсона «Действие наркотиков на холинэстеразу», изданная в 1948 г., и небольшая книжка С. Н. Голикова и В. И. Розенгарта «Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений», вышедшая в свет в 1960 г. Несколько обзорных статей, появившихся в последнее время (М. Я. Михельсон, 1961, 1962; Н. А. Лошадкин, 1961; В. И. Розенгарт, 1962; В. А. Яковлев, 1962), тоже касаются лишь отдельных проблем и не восполняют существующий пробел.

Предлагаемая вниманию читателей книга является первой в отечественной литературе попыткой обобщить в одном издании все основные данные по биохимии холинэстераз, а также по биохимии, фармакологии и токсикологии антихолинэстеразных веществ в таком аспекте, который может представить наибольший интерес для биохимиков, физиологов и врачей.

При написании книги авторы встретились с серьезными трудностями, состоящими прежде всего в необходимости уместить в монографии сравнительно небольшого объема обширный и разнообразный фактический материал. Главным образом по этой причине некоторые очень важные, но не имеющие прямого отношения к медицине разделы, как, например, действие антихолинэстеразных инсектицидов на насекомых и на растения, в книге не рассматриваются.

Авторы отчетливо представляют себе, что при систематизации и изложении столь обширного материала неизбежны отдельные недостатки. Поэтому всякие пожелания и критические замечания будут восприняты с большой благодарностью.

С. Н. Голиков, В. И. Розенгарт



## Часть первая

# ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

---

### ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ПЕРЕДАЧИ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ В СИНАПСАХ И РОЛЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Проблеме структуры холинергических синапсов и механизма осуществляемой в них передачи нервного импульса посвящена обширная литература. Современные представления по этим вопросам достаточно полно изложены в ряде обзоров, содержащих хорошую библиографию (Х. С. Коштойанц, 1951; Wilson, Altamirano, 1956; Grundfest, 1957; Mac Intosh, 1959; А. В. Кибяков, 1959; Nachmansohn, 1959; Нахманзон, 1961; Т. М. Турпаев и др., 1961; И. М. Глаголева и Е. А. Либерман, 1963).

Общую картину строения синапсов удалось составить благодаря детальным электронно-микроскопическим исследованиям. В центральной нервной системе синапс, являющийся границей между функционально контактирующими друг с другом нейронами, можно представить себе в виде узкого пространства (синаптической щели), ограниченного с одной стороны пресинаптической, а с другой — постсинаптической мембранами. Каждая из этих мембран имеет толщину не более 50—60 Å, а ширина щели около 200 Å. По существу, синаптическая щель является непосредственным продолжением межклеточного пространства и содержимое обоих пространств сообщается друг с другом (рис. 1).

Пресинаптическая мембрана состоит из внутреннего слоя, принадлежащего цитоплазме нервного окончания, и наружного слоя, образованного нейроглией. Мембрана в некоторых местах утолщена и уплотнена. Эти места чередуются с менее плотными участками. В электронном микроскопе видно, что пресинаптическая мембрана не является сплошной — она имеет отверстия, сообщающие аксоплазму с синаптическим пространством. Постсинаптическая мембрана представляется менее плотной, но она не имеет перерывов, отверстий.



Обязательным компонентом всякой синаптической структуры являются так называемые пузырьки, или везикулы. Это небольшие тельца, состоящие из более плотного поверхностного слоя и менее плотного внутреннего содержимого. Пузырьки концентрируются в пресинаптических окончаниях и располагаются в непосредственной близости от мембраны. В тех местах, где пресинаптическая мембрана прерывается, пузырьки проникают в синаптическое пространство. Именно эти пузырьки являются местом хранения ацетилхолина в аксональных окон-

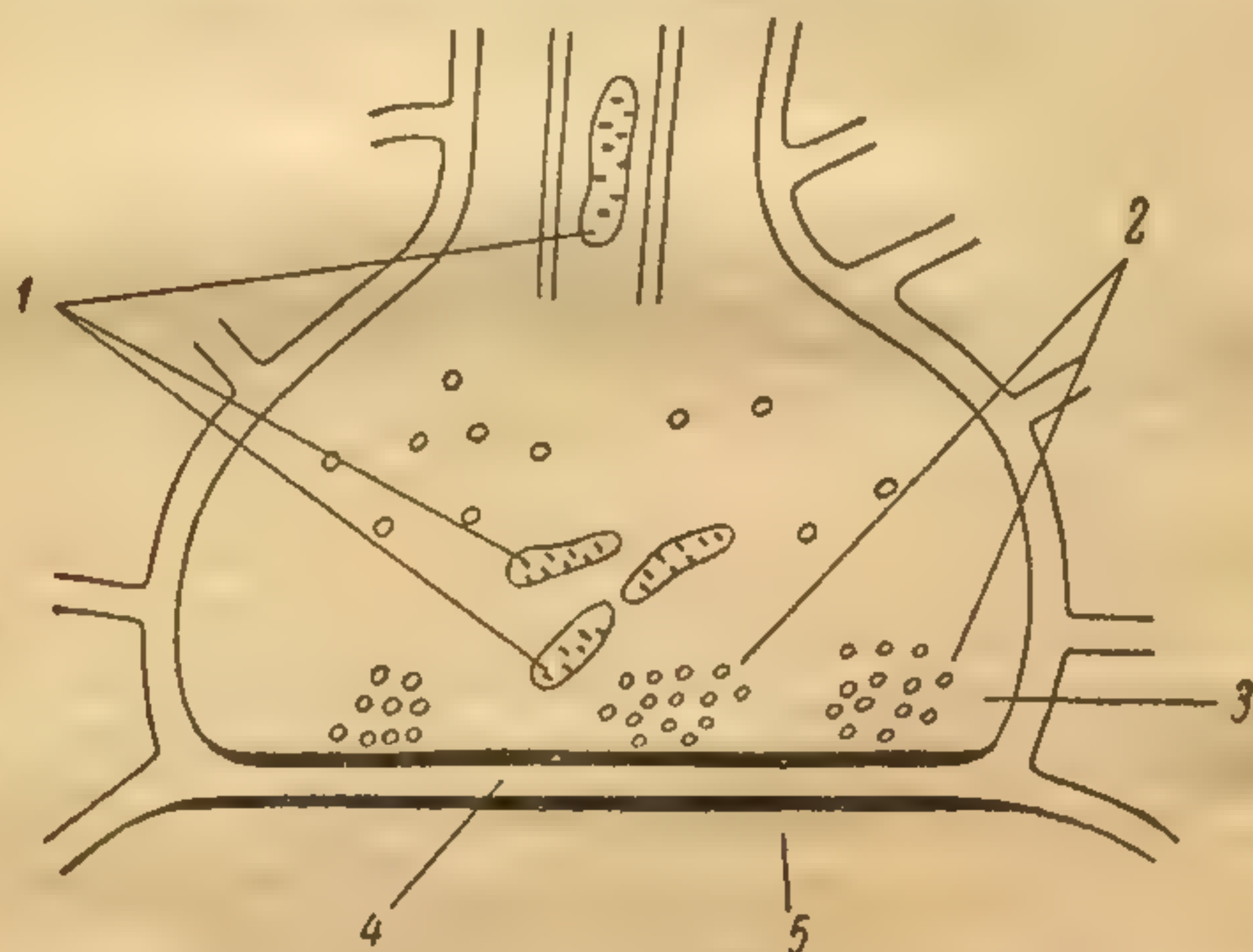


Рис. 1. Схема строения синапса (Mac Intosh, 1959).

1 — митохондрии; 2 — везикулы; 3 — пресинаптическая аксоплазма; 4 — синаптическая щель; 5 — постсинаптическая аксоплазма.

чаниях. Объем каждого пузырька составляет около  $1,3 \cdot 10^{-17}$  мл, и в нем содержится приблизительно 400 молекул ацетилхолина.

Благодаря таким структурным особенностям ацетилхолин в синаптических образованиях пространственно отделен от холинэстеразы, которая внутри клеток расположена на внутренней поверхности пресинаптической мембраны и, возможно, на поверхности пузырьков. Внеклеточная холинэстераза локализуется преимущественно на внешней поверхности пресинаптической мембраны. В митохондриях содержится холинацетилаза — фермент, обеспечивающий синтез ацетилхолина из холина и активированного ацетата.

Сходным образом построены и нервно-мышечные синапсы. Особенностью их структуры является более сложное построение мембранного комплекса, отделяющего мышечную ткань от нервной. Этот комплекс состоит из пяти слоев, четко различимых в электронном микроскопе. В нервно-мышечном синапсе значительная часть холинэстеразы находится на постсинаптической поверхности и не разрушается при денервации.



Описанные структурные отношения находят подтверждение в физиологических наблюдениях. Известно, что в условиях покоя, т. е. без каких-либо внешних раздражений, в нервно-мышечных синапсах лягушки обнаруживается постоянная активность, выражающаяся в наличии очень небольших потенциалов, возникающих через нерегулярные промежутки времени. Эти потенциалы, названные миниатюрными потенциалами, усиливаются под влиянием антихолинэстеразных веществ и ослабля-

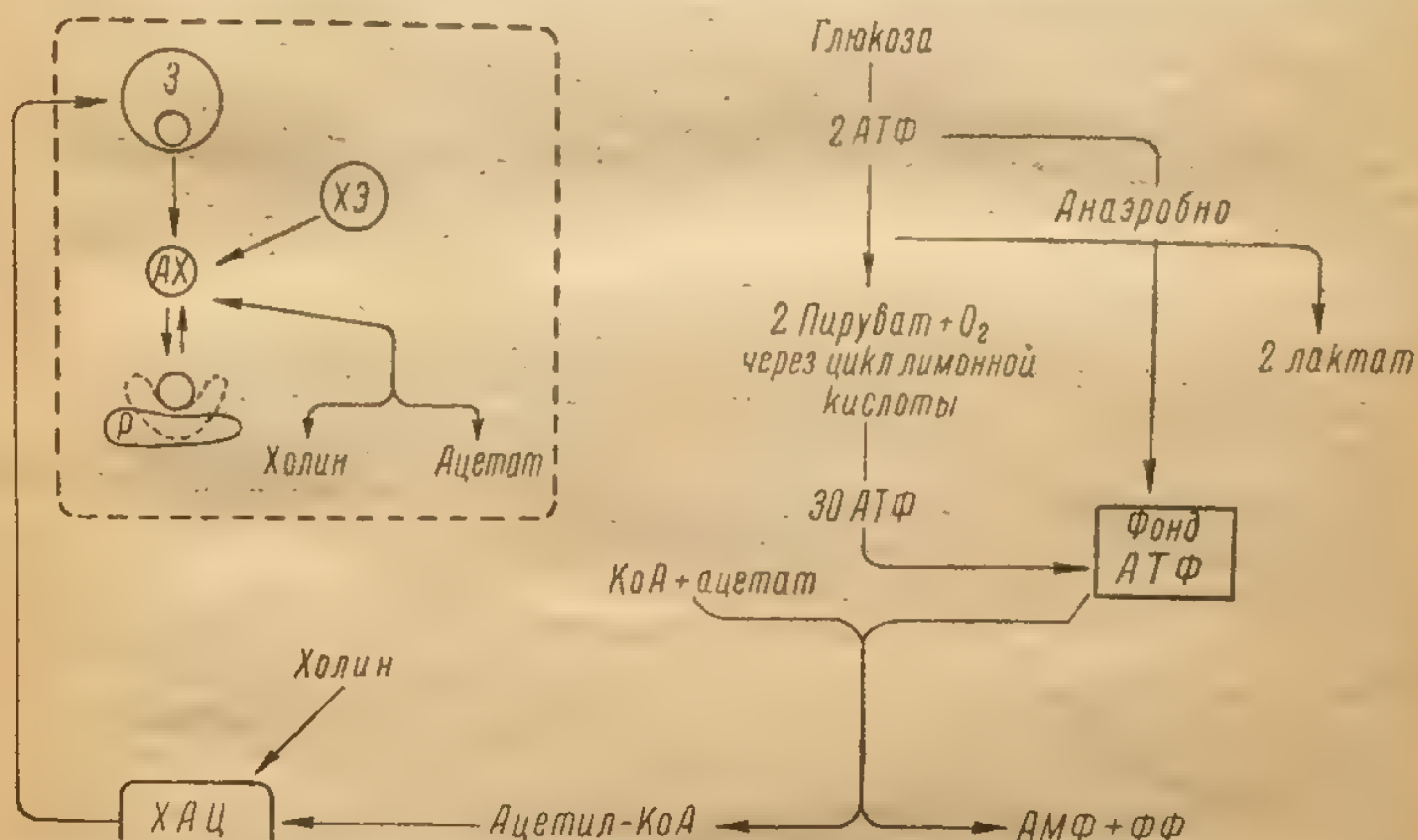


Рис. 2. Схема участия ацетилхолина в осуществлении элементарного процесса нервной деятельности (Д. Нахманзон, 1961).

Реакции, непосредственно относящиеся к элементарному процессу, обведены пунктиром.

ются при действии курареподобных соединений. Миниатюрные потенциалы можно рассматривать как ответную реакцию на постоянную секрецию ацетилхолина пресинаптическим аппаратом. Прерывистый характер этих потенциалов, их нерегулярность свидетельствуют о том, что и секреция ацетилхолина осуществляется не непрерывно, а происходит в виде отдельных порций, квант. Это легче всего понять, если допустить, что минимальное количество ацетилхолина, которое может освободиться в ходе секреции, получается при разрыве одного пузырька, т. е. составляет несколько сотен молекул.

Применительно к изложенным выше данным о морфологическом строении синапса можно представить себе общую биохимическую картину участия ацетилхолина в осуществлении элементарного процесса нервной деятельности — передачи нервного возбуждения (рис. 2).



В состоянии покоя ацетилхолин находится в запасной форме (з) — в связанном с белком состоянии или заключенным в белок (в пузырьках). Под влиянием импульса ацетилхолин (АХ) освобождается, пересекает синаптическую щель и вступает во взаимодействие с белком — рецептором (Р), входящим в состав постсинаптической мембраны. Это взаимодействие сопровождается деполяризацией, которая в свою очередь дает начало новому импульсу в постсинаптическом нейроне или стимулирует специфическую деятельность эффекторного органа. Реакция ацетилхолина с рецептором носит обратимый характер, и оба вещества находятся в динамическом равновесии с образующимся комплексом. Однако свободный ацетилхолин очень быстро гидролизуетс<sup>я</sup> чрезвычайно активной холинэстеразой (ХЭ), в большом количестве содержащейся на внешней поверхности пресинаптической мембраны. Благодаря этому равновесие сдвигается в сторону образования свободного рецептора, комплекс быстро разрушается и, в конце концов, вся поверхность рецептора становится способной воспринимать новую порцию ацетилхолина. Независимо от этого в клетке происходит синтез ацетилхолина под действием холинацетилазы (ХАЦ), содержащейся в митохондриях. Этот процесс тесно связан с аэробным и анаэробным энергетическим обменом в клетке, так как образование необходимого для ацетилирования холина ацетилкоэнзима А (Ац-КоА) нуждается в энергии, поставляемой в форме аденозинтрифосфата (АТФ).

Для понимания медиаторной функции ацетилхолина очень важно разобраться в механизме реакции между ацетилхолином и рецепторным белком. Вопрос этот далек от своего разрешения, так как первые сведения о выделении рецепторного белка и возможности исследования его свойств *in vitro* появились лишь недавно (Т. М. Турпаев и С. Н. Нистратова, 1959; Т. М. Турпаев и др., 1961; Ehrenpreis, 1960, 1962а, б). По современным представлениям, при реакции с ацетилхолином происходит местное изменение конфигурации рецепторного белка (в этом процессе существенную роль играют, по-видимому, сульфгидрильные группы белка), что обуславливает повышение проницаемости постсинаптической мембраны для ионов. Эта реакция служит своего рода «пусковым механизмом», управляющим движением ионов, и приводит в действие потенциальный источник энергии — градиент концентрации ионов по обе стороны мембраны. Ионы натрия начинают диффундировать из внешней среды в клетку, а ионы калия — из клетки во внешнюю среду. В результате этого на мембране возникает местный, нераспространенный, локализованный участок деполяризации, называемый постсинаптическим потенциалом. Последний электрогенным путем вызывает потенциал действия нерва, распростра-



няющийся вдоль постсинаптического волокна. Схема действия ацетилхолина в ганглионарном синапсе представлена на рис. 3.

В самое последнее время Келле (Koelle, 1961, 1962), главным образом на основании детального гистохимического изучения локализации холинэстеразы в синапсах, пришел к выводу, что ацетилхолин, освобождающийся под влиянием нервного импульса, действует прежде всего в тех же пресинаптических окончаниях, где он освобождается. В результате этого возникают дополнительные кванты ацетилхолина, и это вторично освобожденное, повышенное количество медиатора уже действует на постсинаптическую мембрану, обеспечивая передачу импульса.

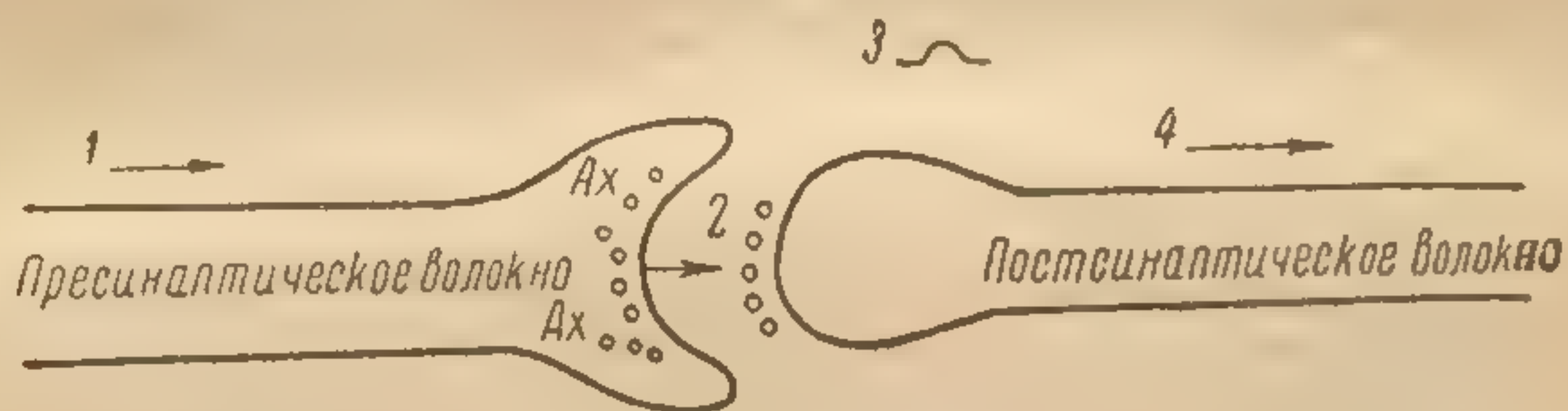


Рис. 3. Схема действия ацетилхолина в холинергическом синапсе (Koelle, 1962).

Импульс (1) вызывает освобождение ацетилхолина (АХ) в окончании аксона. АХ диффундирует (2) через щель и реагирует с постсинаптическими рецепторами, в результате чего возникает местный постсинаптический потенциал (3), который электрогенным путем вызывает импульс (4) в постсинаптическом волокне.

Более того, по мнению Келле, ацетилхолин принимает непосредственное участие в передаче импульса во многих типах нехолинергических синапсов. Предполагается, что там существует механизм, аналогичный только что описанному: ацетилхолин, освобождающийся в пресинаптических окончаниях, действует на эти же окончания и стимулирует этим секрецию другого, специфического для данного типа синапса медиатора, который диффундирует через щель и оказывает постсинаптический эффект.

Среди биохимических реакций, лежащих в основе элементарного процесса нервной деятельности (см. рис. 2), для данной книги наибольший интерес представляет взаимодействие ацетилхолина с холинэстеразой. Механизм этой реакции и участвующие в ней молекулярные силы подробно будут разобраны ниже, а сейчас необходимо лишь в самых общих чертах охарактеризовать физиологическую роль холинэстеразы. Единственная функция этого фермента состоит в гидролитическом разрушении ацетилхолина, в результате чего последний утрачивает свою физиологическую активность. Совершенно очевидно, что эта единственная реакция холинэстеразы может иметь самое различное функциональное значение в зависимости от того, где она осуществляется. Например, в нервно-мышечных







что полное угнетение холинэстеразы плазмы совместимо с жизнью.

Столь же неясно значение ложной холинэстеразы центральной нервной системы. Имеются данные, что эффект «пробуждения», вызываемый ингибиторами холинэстеразы и зависящий от действия на ретикулярную формацию мозга, обусловлен угнетением именно ложной, а не истинной холинэстеразы (Desmedt et al., 1957).

На основании данных о том, что некоторые ингибиторы ложной холинэстеразы вызывают у животных параличи, связанные с демиелинизацией нервных волокон (Earl, Thompson, 1952), было высказано предположение, что этот фермент существенно необходим для образования или поддержания миелиновой оболочки нервов. Однако эта гипотеза не может считаться достаточно обоснованной, так как далеко не всегда длительное угнетение фермента приводит к демиелинизации, а иногда демиелинизация наблюдается и при кратковременном подавлении холинэстеразы (Barnes, Denz, 1953).

В 1953 г. В. В. Португалов и В. А. Яковлев высказали предположение о том, что ложная холинэстераза выполняет роль дополнительного аварийного механизма, гидролизующего ацетилхолин, который выделился нервными окончаниями, но не разрушился вследствие каких-то особых причин истинной холинэстеразой.

Леманн и Силк (Lehmann, Silk, 1953, 1955), Леманн и Лидел (Lehmann, Liddell, 1961) высказали предположение, что роль ложной холинэстеразы нервной системы сводится к защите истинной холинэстеразы от угнетающего действия таких эфиров холина (пропионилхолин, бутирилхолин, валерилхолин, некоторые ароматические эфиры холина), которые не разрушаются истинной холинэстеразой, но могут образовываться в организме (Nachmansohn et al., 1949; Banister et al., 1951). Леманн показал, что введение кроликам ложной холинэстеразы защищает их от парализующего действия бензоилхолина. Возможно также, что в отдельных участках мозга могут создаваться ненормально высокие концентрации ацетилхолина, избыток которого, как известно (см. ниже), выраженно тормозит истинную холинэстеразу, но не влияет на ложную. Разрушение избыточных количеств ацетилхолина может осуществляться имеющейся в мозгу ложной холинэстеразой.

Гипотезу о защитной функции ложной холинэстеразы поддерживает и А. Н. Панюков (1963), который считает, что ее действие направлено главным образом на разрушение образующегося в мозгу бутирилхолина.

По данным А. Н. Панюкова, бутирилхолин обладает выраженной способностью подавлять активность истинной холинэстеразы всех отделов мозга у самых различных видов животных.



# ОБЩИЕ СВОЙСТВА ХОЛИНЭСТЕРАЗ

## ОТКРЫТИЕ, НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

В 1921 г. Леви (Loewi) своими классическими опытами продемонстрировал медиаторную роль ацетилхолина в процессе передачи нервного импульса.

Через 5 лет, в 1926 г., Леви и Навратил (Loewi, Navratil, 1926) открыли, что в лягушачьем сердце содержится фермент, обладающий способностью быстро инактивировать ацетилхолин путем расщепления его на холин и уксусную кислоту. Еще через 6 лет Стедман и сотр. (Stedman et al., 1932) обнаружили аналогичный фермент в лошадиной сыворотке и впервые предложили для его обозначения термин «холинэстераза». В дальнейшем было установлено (Alles, Hawes, 1940), что холинэстераза сыворотки и крови по ряду свойств существенно отличается от фермента эритроцитов.

В настоящее время различают два типа холинэстеразы: истинную и ложную. Каждое из этих названий имеет значительное число синонимов, благодаря чему в обширной литературе, посвященной холинэстеразе, оба фермента именуются самым различным образом. Следующая таблица дает представление о наиболее употребительной номенклатуре холинэстераз.

Таблица 1

### Номенклатура холинэстераз

Истинная холинэстераза	Ложная холинэстераза
Ацетохолинэстераза	Бутирохолинэстераза
Ацетилхолинэстераза	Бутирилхолинэстераза
Специфическая холинэстераза	Неспецифическая холинэстераза
Холинэстераза I	Холинэстераза II
e-холинэстераза	s-холинэстераза

В недавно опубликованном отчете комиссии по ферментам Международного биохимического союза (Классификация и номенклатура ферментов, 1962) для истинной холинэстеразы предложено систематическое название «ацетилгидролаза ацетилхолина», и ей присвоен шифр 3.1.1.7. Ложную холинэстеразу предложено называть «ацилгидролаза ацилхолинов» с шифром 3.1.1.8. Кроме того, в самостоятельную систематическую единицу выделена бензоилхолингидролаза (бензоилхолинэстераза) с шифром 3.1.1.9. Для фермента 3.1.1.7 рекомендовано тривиальное (рабочее) название «ацетилхолинэстераза», а для фермента 3.1.1.8 — «холинэстераза».

В дальнейшем изложении мы будем пользоваться термином «холинэстераза» как неспецифическим названием, обозначающим оба фермента.



Истинная и ложная холинэстеразы отличаются друг от друга по многим признакам, благодаря чему их нетрудно раздельно выявлять и количественно определять. Прежде всего эти различия касаются субстратной специфичности. Подробнее этот вопрос будет рассмотрен ниже, а здесь достаточно отметить, что среди холиновых эфиров оптимальным субстратом истинной холинэстеразы является ацетилхолин, а ложной — бутирилхолин. Очень важная особенность истинной холинэстеразы состоит в том, что для проявления максимальной активности она нуждается в строго определенной, оптимальной концентрации субстрата; избыток субстрата тормозит активность фермента. У ложной холинэстеразы это свойство отсутствует: при повышении концентрации субстрата ее активность постепенно возрастает. Необходимо подчеркнуть, что способность избытка субстрата тормозить активность истинной холинэстеразы относится только к холиновым эфирам. Различить оба фермента можно также, пользуясь избирательными субстратами и ингибиторами. Избирательным субстратом истинной холинэстеразы может служить ацетил- $\beta$ -метилхолин, который легко гидролизуеться этим ферментом, но весьма устойчив к действию ложной холинэстеразы. В то же время специфические субстраты ложной холинэстеразы — бутирилхолин и бензоилхолин — под действием истинной холинэстеразы практически не разрушаются. Более того, бутирилхолин обладает способностью подавлять активность этого фермента (Kalsbeck et al., 1950; Cohen et al., 1951) и в известных условиях может быть использован как избирательный ингибитор истинной холинэстеразы. Типичными избирательными ингибиторами истинной холинэстеразы являются также многие бис-четвертичные аммониевые соединения, обратимо угнетающие активность фермента. Это О, О'-бис (N-этилинхолин-8)-пентаметилен-гликолийодид (RP-3381); N, N'-бис-(диэтил-2-хлорбензиламмонийметил)-оксамиддихлорид (WiN-8077), известный также под названиями: амбеноний, мителаза, мисуран; 1, 5-бис-(N-аллил-N, N-диметил-4-аммонийфенил)-пентан-3-ондибромид (284 с 51 В. W.); бис-(N-метилпиперидиний-N-2-метилкумаринил-5)-кетондийодид (СТ-3318); бис-(триэтиламмоний-этил)-изофталатдийодид (IS-337) и др. Некоторые фосфорорганические ингибиторы, необратимо угнетающие холинэстеразу, тоже предпочтительно действуют на истинный фермент. К ним относятся метилфторфосфорилгомохолин и метилэтоксифосфорилтиохолин.

Способностью избирательно угнетать ложную холинэстеразу обладают многие фосфорорганические соединения, особенно те, которые содержат в своем составе изопропильные группы: ди-изопропилфторфосфат (ДФФ), тетраизопропилпирофосфорамид (изо-ОМПА), ди-(изопропиламино)-фторфосфат (мипафокс) и др. Из обратимых ингибиторов избирательно действуют на



ложную холинэстеразу этопропазинметилсульфат (лизиван), вещества IS-306, Nu-683 и некоторые другие.

Наиболее существенные черты отличия между истинной и ложной холинэстеразой представлены в табл. 2.

Таблица 2

Отличительные свойства истинной и ложной холинэстераз

Сравнительные тесты	Истинная холинэстераза	Ложная холинэстераза
Быстрее всего гидролизует	Ацетилхолин	Бутирилхолин
Не гидролизует	Бутирилхолин, бензоилхолин	Ацетил-β-метилхолин
Влияние избытка субстрата	Тормозит	Не тормозит
Избирательные ингибиторы	Некоторые бис-четвертичные соединения (RP-3381, WIN-8077, 284 с 51 В. W., CT-3318 и др.)	Фосфорорганические ингибиторы, содержащие изопропильные группы (ДФФ, изо-ОМПА, мипафокс и др.).

Описанные выше свойства, характеризующие истинную и ложную холинэстеразу, являются типичными. Они получены главным образом при исследовании таких ферментов, как истинная холинэстераза эритроцитов человека и мозга млекопитающих, электрического органа рыб и ложная холинэстераза сыворотки крови человека и лошади. В подавляющем большинстве случаев холинэстераза и другого происхождения, на основании изучения ее свойств, может быть отнесена к тому или другому типу. Однако встречаются исключения из этого правила. Так, холинэстераза сыворотки и мозга птиц (цыпленок, утка, голубь) и холинэстераза сыворотки крыс оказалась устойчивой как к типичному ингибитору ложной холинэстеразы — эукуприну, так и к веществу, избирательно подавляющему активность истинного фермента, — СТ-3318 (Ferrari, 1957). Более подробное исследование свойств холинэстеразы курицы показало, что фермент мозга и скелетной мышцы может быть отнесен к типу истинной холинэстеразы, хотя от соответствующего фермента млекопитающих он отличается несколько меньшей чувствительностью к бис-четвертичным ингибиторам. Что же касается холинэстеразы плазмы крови и слизистой кишечника, то она занимает промежуточное положение. По локализации ее следует отнести к ложной холинэстеразе; подобно ложному ферменту, она не тормозится избытком ацетилхолина или бутирилхолина, однако избыток пропионилхолина резко подавляет ее активность, что является уже свойством истинной холинэстеразы; специфический ингибитор истинной холинэстеразы —



1,5-бис-(4-триметиламмонийфенил)-пентап-3-он действует на нее в 10 000 раз сильнее, чем избирательный ингибитор ложного фермента — этопропазин (Blaber, Cuthbert, 1962).

Несмотря на имеющиеся исключения, принцип разделения холинэстеразы на два типа (истинную и ложную) может считаться вполне оправданным, так как в большинстве случаев эти два типа фермента отличаются друг от друга не только ясно выраженными биохимическими особенностями, но и физиологически, по той функциональной роли, которую они играют в организме.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Холинэстераза чрезвычайно широко распространена в животном мире и, по-видимому, встречается и в растениях. Так, в дрожжах с низким ферментирующим действием был обнаружен чувствительный к эзерину фермент, расщепляющий ацетилхолин. Дрожжи с высокой ферментирующей активностью не содержали холинэстеразы (Jacobsohn, Azevedo, 1962). У животных содержание холинэстеразы отличается исключительным разнообразием и зависит как от их вида, так и от характера ткани (табл. 3 и 4).

Таблица 3  
Активность холинэстеразы в тканях кроликов и собак  
(в  $\mu$  молях ацетилхолина на 1 мг ткани в 1 ч).  
Tigerman et al., 1956

Орга	Кролик	Собака
Сердце . . . . .	0,061	0,065
Мышца . . . . .	0,026	0,041
Печень . . . . .	0,801	1,130
Мозг . . . . .	3,450	0,390
Почка . . . . .	0,027	0,070
Кишечник . . . . .	0,235	0,180

Таблицы показывают, что особенно выражены видовые отличия активности холинэстеразы крови. Так, плазма мыши в 150 раз активнее плазмы барана; в эритроцитах мыши содержится в 15 раз меньше холинэстеразы, чем в плазме, а в эритроцитах быка — почти в 40 раз больше, чем в плазме. Аналогичные данные приводит Kolb (1957). Детальное определение активности холинэстеразы в различных участках отдельных электрических органов *Electrophorus electricus* показало, что содержание фермента колеблется в широких пределах как в различных участках одного и того же органа (от 238 до 1327 ед. на 1 г ткани), так и в разных органах (от 270 до 2820 ед.)



(Couceiro et al., 1958). В организме насекомых фермент распределен тоже очень неравномерно. Так, в головах мух содержится 70% всей холинэстеразы, в груди — 25%, а в брюшке — только 5% (Aspergen, 1959).

Таблица 4

Активность холинэстеразы в плазме  
и эритроцитах различных животных  
(в ΔpH, метод Мичела). — Chary et al., 1959

Вид животного	Плазма	Эритроциты
Мышь . . . . .	1,51	0,09
Лошадь . . . . .	0,82	0,16
Человек . . . . .	0,66	0,70
Собака . . . . .	0,43	0,60
Морская свинка . . . . .	0,26	0,18
Кошка . . . . .	0,22	0,06
Курица . . . . .	0,15	0,03
Кролик . . . . .	0,10	0,12
Свинья . . . . .	0,10	0,25
Крыса . . . . .	0,07	0,08
Бык . . . . .	0,01	0,37
Баран . . . . .	0,01	0,21

Характер распределения истинной и ложной холинэстеразы в организме животных оказался различным. Истинная холинэстераза содержится преимущественно в сером веществе мозга, в эритроцитах, в симпатических ганглиях, двигательных концевых пластинках. Ложная холинэстераза встречается главным образом в плазме крови, слизистой оболочке кишечника, поджелудочной железе, печени. Малоактивный фермент был обнаружен в тромбоцитах (Vincent et al., 1962). Необходимо отметить, что в большинстве перечисленных тканей можно обнаружить оба фермента. Так, по данным ряда исследователей, в мозгу наряду с истинной содержится ложная холинэстераза (Burgen, Chipman, 1952; Bernsohn, 1957, 1958; Holmstedt, 1959). Ложная холинэстераза найдена также в эритроцитах (Davies, Rutland, 1956). В то же время истинная холинэстераза была обнаружена в печени (Goutier et al., 1954, 1955). Холинэстераза неравномерно распределена между субклеточными фракциями тканей. В печени больше всего холинэстеразы содержится в микросомах; в ядрах, по данным разных исследователей, обнаруживается от 7 до 50% того количества холинэстеразы, которое имеется в цитоплазме; митохондрии отличаются низкой холинэстеразной активностью (Goutier et al., 1955; Underhay et al., 1956). Сведения о содержании холинэстеразы в субклеточных фракциях нервной ткани противоречивы. Одни исследователи



(Nathan, Aprison 1955; Toschi, 1959) считают, что основная масса фермента (до 90%) связана с частицами, а надосадочная жидкость почти лишена холинэстеразной активности; при этом на долю митохондрий приходится около 70% всей активности фермента. В отличие от этого, Пармар и др. (Parmar et al., 1961) приводят следующие цифры распределения холинэстеразы по фракциям нервной ткани: надосадочная жидкость — 36—40%, микросомы — 43—51%, митохондрии — 6—15%, ядра — 3—4%. Высокую активность холинэстеразы в микросомах отметили также Clouet, Waelch (1961). По данным этих авторов, в ядрах нервных клеток содержится преимущественно ложная холинэстераза. Большая часть активности надосадочной жидкости также зависит, по-видимому, от ложной холинэстеразы (Holmstedt, Toschi, 1959). Возможно, что противоречивость приведенных выше данных объясняется различиями в методике выделения субклеточных фракций у разных авторов. Дело в том, что по последним данным даже в пределах одного типа субклеточных частиц холинэстераза распределена неравномерно. Де Робертис и др. (De Robertis et al., 1962) дробным центрифугированием разделили митохондрии мозга на 5 подфракций и показали, что только одна из них характеризуется высокой активностью холинэстеразы.

Большой интерес представляет распределение холинэстеразы по различным отделам нервной системы. Этому вопросу посвящено значительное число работ, однако их результаты трудно обобщить, так как в разных исследованиях применялись различные методы определения и способы выражения активности фермента. Главный вывод, который вытекает из рассмотрения этих данных, сводится к тому, что активность холинэстеразы отличается чрезвычайным разнообразием у разных видов животных и колеблется в широких пределах в разных морфологических образованиях нервной системы. Активность холинэстеразы в нервных волокнах сравнительно невелика; в тех участках, где имеется скопление клеточных тел и синаптических соединений, концентрация фермента обычно в 3—5 раз выше, чем в соответствующих волокнах. Миелиновые нервы, как правило, характеризуются более низкой активностью фермента, чем безмякотные. Было отмечено падение активности холинэстеразы вдоль нерва в проксимально-дистальном направлении. Это падение составляло 0,4—7,2% на каждые 10 мм нерва. Например, в диафрагмальном нерве собак в начале ствола активность была на 40% выше, чем в конце ствола (Lubinska et al., 1963).

Табл. 5 дает представление о распространении холинэстеразы в мозгу разных животных. Из таблицы видно, что наибольшей активностью фермента отличаются хвостатое тело и чечевицеобразное ядро, а наименьшей — белое вещество. Интересно отметить, что у небольших животных, таких как мышь,



Таблица 5

Активность холинэстеразы в мозгу различных видов животных (цифры выражают количество мг ацетилхолина, которое может быть разрушено 1 г свежей ткани за 1 ч при 37°). — Nachmansohn, 1959

Отдел мозга	Активность холинэстеразы			
	кролик	собака	бык	человек
Кора	60—80	20—50	20—30	12
Белое вещество	—	3	2—3	—
Хвостатое тело	350	500—600	400	300
Чечевицеобразное ядро	—	—	680	460
Мозжечок	90—100	120—150	20—40	80
Таламус	120	60	50	3
Мост	130	70—80	—	60
Переднее четверохолмие	250	140	100—120	60
Заднее четверохолмие	130	50	40	30

крыса, морская свинка, концентрация холинэстеразы в мозгу значительно выше, чем у кошки, собаки и других более крупных животных. У одного и того же вида животных активность фермента в отдельных структурах мозга отличается удивительным постоянством. (Nachmansohn, 1959).

Среди работ, посвященных исследованию распространения холинэстеразы в центральной нервной системе, заслуживает внимания обстоятельное исследование А. А. Покровского и Л. Г. Пономаревой (1961), которые отдельно определили активность истинной и ложной холинэстеразы более чем в 50 морфологически и функционально различных образованиях головного мозга обезьян. В коре больших полушарий активность истинной холинэстеразы была сравнительно невысокой и примерно одинаковой во всех исследованных участках (1,0—1,5  $\mu$ моля субстрата на 1 г ткани в 1 мин). Исключение составляла область обонятельного поля, где активность фермента достигала 68,0  $\mu$ молей, т. е. в 50 раз превышала среднюю величину, полученную для других участков коры. В ядрах таламуса и гипоталамуса содержание холинэстеразы было в 5—6 раз больше, чем в коре. Значительно более низкая активность фермента была отмечена в большинстве проводящих путей. Привлекает внимание факт высокого содержания истинной холинэстеразы в ядрах экстрапирамидной системы. Так, в различных участках хвостатого тела активность фермента колебалась от 38,9 до 46,8  $\mu$ моля. Распределение ложной холинэстеразы оказалось значительно более равномерным. В большинстве участков коры она была в 4—7 раз менее активной, чем истинная. В тех образованиях, которые отличались высоким содержанием истинной холинэстеразы, активность ложной тоже была увеличена, но в значительно меньшей степени, и поэтому доля ложной



холинэстеразы в общей холинэстеразной активности этих образований была гораздо меньше.

При разделении гомогенатов мозга с помощью электрофореза на различных поддерживающих средах было установлено, что истинная холинэстераза локализуется не в одной, а в нескольких зонах, отличающихся друг от друга по электрофоретической подвижности. Так, в мозгу крыс были найдены две полосы истинной холинэстеразы (Fränkö et al., 1962), а в мозгу человека — три полосы (Bernsohn et al., 1962). Это дало основание высказать предположение о множественной природе истинной холинэстеразы мозга и о возможном различии функциональной роли отдельных холинэстераз.

С развитием гистохимической техники появилась возможность более точно определить локализацию холинэстеразы в гистологических структурах различных тканей. По данным Келле (Koelle, 1951, 1954, 1955 a), Абрахамса и соавт. (Abrahams et al., 1957), в головном мозгу истинная холинэстераза содержится преимущественно в двигательных нейронах черепномозговых двигательных ядер; в нейронах, дающих начало преганглионарным автономным волокнам; в нейронах ретикулярной формации и клиновидного ядра, а также в некоторых третичных афферентных нейронах, например в латеральных ядрах таламуса. В гипоталамусе активный фермент был обнаружен лишь в незначительном числе клеток некоторых ядер. Низким содержанием холинэстеразы или полным ее отсутствием характеризуются нейроны некоторых коррелятивных центров, заложенных в оливах, а также часть нейронов красного ядра. При сочетании электронно-микроскопических и гистохимических исследований было показано, что истинная холинэстераза содержится преимущественно в мембранных участках нейронов, в пре- и постсинаптических образованиях некоторых синапсов, иногда — в синаптических пузырьках (Togack, 1962). Что касается ложной холинэстеразы, то еще в ранних исследованиях (Ord, Thompson, 1952) было установлено, что она локализуется преимущественно в белом веществе. Согласно последним данным (Goldberger, 1961), она содержится только в эндотелии капилляров, гладких мышцах артериол и в некоторых глиальных клетках. В спинном мозгу активная истинная холинэстераза содержится в нейронах передних и латеральных рогов (Koelle, 1951, 1952). Наличие истинной холинэстеразы было показано во всех типах нейронов верхнего шейного ганглия кошек, кроликов и обезьян (Koelle, 1955b). Было также установлено, что в холинергических нейронах концентрация фермента значительно выше, чем в адренергических и чувствительных. В нейронах двух последних типов активность ферментов сильно варьировала в зависимости от места расположения нейрона и вида животного.



Большое число исследований посвящено выяснению локализации холинэстеразы в поперечнополосатых мышцах. Истинная холинэстераза обнаруживается в следующих четырех участках: наиболее активный фермент расположен в концевых пластинках экстрафузальных волокон; менее активная холинэстераза содержится в концевых пластинках интрафузальных волокон; еще менее активная — в мышечно-сухожильных холинергических аппаратах и в окончаниях тонких двигательных волокон. Такой характер распределения холинэстеразы в мышцах оказался свойственным всем исследованным видам животных (собака, кошка, морская свинка, крыса, мышь, голубь, курица) и человеку (Gerebtzoff, 1955). Наряду с истинной холинэстеразой в нервно-мышечных синапсах была обнаружена ложная (Holmstedt, 1957; Barrnett, 1962).

В связи с широким распространением холинэстеразы в мышцах интересно упомянуть о большой серии исследований венгерских ученых (Varga et al., 1954, 1955, 1957a, 1957b; Köver et al., 1957a, 1957b; Varga, 1959), показавших, что выраженной холинэстеразной активностью обладает мышечный миозин.

Холинэстераза содержится во многих других тканях. Истинный фермент был найден в гладких мышцах бронхиол и мочевого пузыря, в эффекторных клетках слюнных желез и в сетчатой ткани, окружающей ганглионарные клетки мозгового слоя надпочечника. Ложная холинэстераза содержится в каротидных клубочках, клетках печени и слизистой оболочки кишечника, а также в корковом слое надпочечника (Koelle, 1951; Dejardin, 1954). Подробные данные о распространении холинэстеразы в водянистой влаге и стекловидном теле глаза приведены в исследовании Бастида (Bastide, 1962).

Ценность гистохимических методов определения холинэстеразы состоит в том, что они дают возможность с большой точностью определить локализацию фермента в гистологических структурах тканей, однако они не позволяют, к сожалению, количественно оценить содержание холинэстеразы в этих структурах. В лучшем случае удастся выяснить, что в одних участках холинэстеразы много, а в других ее мало.

В последние годы благодаря усовершенствованию количественных ультрамикрометодов определения холинэстеразы этот пробел постепенно восполняется. Применение модифицированной газометрической методики «картезианского водолаза» (Zajisek, 1957) в настоящее время позволило анализировать не только индивидуальные маленькие нервные клетки (сухой вес около  $5 \cdot 10^{-3}$  г), но и определять активность холинэстеразы в отдельных элементах нейрона (ядро, ядрышко, небольшие участки дендритов и аксонов) и исследовать ничтожные пробы цитоплазмы, имеющие объем порядка  $10^{-9}$  мл (Giacobini, Zajisek, 1956; Giacobini, 1959a, 1959b). Было установлено, что, как пра-



вило, наибольшей активностью характеризуется тело клетки, в аксонах и дендритах содержится несколько меньше фермента, в ядре — в 10—100 раз меньше, чем в цитоплазме, а в ядрышке холинэстеразы практически нет совсем.

Для энзимолога, а особенно для фармаколога, главный интерес представляет именно оценка функционального значения холинэстеразы разной локализации. В этом отношении значительный интерес представляют исследования Келле, в которых он сочетал гистохимическую методику с применением избирательных ингибиторов и реактиваторов холинэстеразы (Koelle, 1957a, 1957b; Koelle и Koelle, 1959; McIsaak, Koelle, 1959). Известно, что обратимые бис-четвертичные ингибиторы холинэстеразы защищают фермент от последующего воздействия необратимых ингибиторов типа диизопропилфторфосфата (ДФФ). Однако гистохимические исследования симпатических ганглиев показали, что введение крысам такого обратимого ингибитора, как, например, амбеноний, защищает только наружную, внеклеточную холинэстеразу, тогда как внутриклеточная холинэстераза при последующем введении ДФФ оказывается полностью угнетенной. Это объясняется тем, что амбеноний как четвертичное соединение плохо проникает через клеточную мембрану. Таким образом, по крайней мере для клеток симпатических ганглиев, было четко показано существование пространственно разобщенных друг от друга «наружной» и «внутренней» холинэстеразы.

Из дальнейших исследований, в которых применялись реактиваторы холинэстеразы и производилось сопоставление гистохимических данных с физиологическими изменениями, был сделан вывод, что функциональную роль играет только наружный фермент; что же касается внутренней холинэстеразы, то она служит резервом для пополнения запасов наружной. Как уже указывалось, такое представление о раздельном существовании функциональной и резервной холинэстеразы имеет исключительно важное значение для понимания механизма действия антихолинэстеразных веществ.

До сих пор мы рассматривали распространение и локализацию тканевой холинэстеразы, преимущественно фермента нервной ткани. Несколько особняком стоит вопрос о сывороточной холинэстеразе, функция которой до настоящего времени остается невыясненной. Распределение холинэстеразы в сыворотке или в плазме крови изучалось главным образом электрофоретическими методами с целью установить, с какими белковыми фракциями крови связан этот фермент (Cohen, Warringa, 1957; Grouchy, 1958; Augustinsson, 1959; Bernsohn et al., 1961; Hargis et al., 1962). В сыворотке крови было обнаружено большое число эстераз, отличающихся друг от друга по электрофоретической подвижности, но собственно холинэстераза, характеризующаяся по субстратной специфичности и по способности



угнетаться избирательными ингибиторами, концентрировалась, как правило, в одной зоне и располагалась между  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинами. И в этих исследованиях были отмечены чрезвычайно резкие видовые различия в концентрации холинэстеразы. У подавляющего большинства исследованных видов, в том числе у человека, лошади, обезьяны, коровы и у обычных лабораторных животных, фермент сыворотки мог быть отнесен к ложной холинэстеразе. Только в сыворотке коз была обнаружена истинная холинэстераза.

Известно большое число исследований, в которых активность холинэстеразы сыворотки крови у людей определяли в различных физиологических и патологических условиях (А. А. Покровский, 1962; Lehmann, Liddell, 1961). У здоровых взрослых людей активность фермента не зависела от пола и возраста и колебалась в очень узких пределах в течение суток. У беременных женщин активность фермента была несколько ниже, а у детей — немного выше, чем у здоровых взрослых.

Отчетливо выраженные изменения активности сывороточной холинэстеразы могут наблюдаться при различных заболеваниях. Резкое понижение активности характерно для отравлений фосфорорганическими инсектицидами (этот вопрос более подробно будет рассмотрен ниже) и для некоторых заболеваний печени, особенно для таких, которые связаны с поражением паренхиматозной ткани. Леманн считает, что определение активности холинэстеразы сыворотки можно рассматривать как достаточно чувствительную пробу для оценки функциональной способности печени.

### СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Холинэстеразы, как и другие эстеразы, относятся к ферментам, обладающим лишь относительной специфичностью, определяемой наличием сложноэфирной связи в молекуле субстрата. Тем не менее, скорость гидролиза в значительной степени зависит от строения как алкильной, так и ацильной части молекулы субстрата. От других эстераз холинэстеразы отличаются способностью с большой скоростью гидролизовать холиновые эфиры. Именно это обстоятельство послужило основанием для выделения холинэстераз в особую группу ферментов. Вопросу о специфичности отдельных холинэстераз по отношению к различным субстратам посвящена обширная литература, хорошо обобщенная в ряде обзоров и крупных экспериментальных работ (Adams, 1949; Adams, Whittaker, 1949; Whittaker, 1951; Holmstedt, 1959; Nachmansohn, 1959; Dixon, Webb, 1960, и др.).

Исследование субстратной специфичности холинэстераз связано со значительными экспериментальными трудностями, главная из которых состоит в том, что эти ферменты не были полу-



чены в кристаллическом виде и, следовательно, никогда нет уверенности в том, что изучаемый препарат представляет собой индивидуальный фермент. Поэтому разная скорость, с которой происходит гидролиз различных сложных эфиров, может быть отнесена как за счет индивидуальных особенностей одного фермента, так и за счет того, что каждый препарат представляет собой неодинаковую по составу смесь нескольких ферментов. Далее, многие сложные эфиры, особенно производные высших жирных кислот, не растворимы в воде, благодаря чему невозможно получить сравнительные данные о скорости гидролиза разных субстратов в строго сопоставимых условиях. Наконец, серьезной помехой для сравнительных исследований является отмеченная уже способность избытка ацетилхолина тормозить активность истинной холинэстеразы. Хотя перечисленные трудности и преодолеваются исследователями различными путями, однако именно они служат важнейшей причиной того, что данные о субстратной специфичности холинэстераз нередко носят противоречивый характер.

Впервые различие в специфичности между ложной и истинной холинэстеразой продемонстрировали Аллес и Хоус (Alles, Hawes, 1940). В то время такого подразделения холинэстераз еще не существовало, и названные авторы показали лишь, что холинэстераза эритроцитов четко отличается от холинэстеразы сыворотки. Для фермента эритроцитов было установлено наличие оптимума концентрации субстрата: при избытке ацетилхолина скорость гидролиза снижалась. Было также показано, что холинэстераза эритроцитов, в отличие от сывороточной, обладает способностью гидролизовать ацетил- $\beta$ -метилхолин. В дальнейшем эти данные были подтверждены (Richter, Croft, 1942), а вскоре Целлер и Биссеггер (Zeller, Bissegger, 1943) установили, что холинэстераза мозга по своим свойствам очень близка ферменту эритроцитов.

Значительный интерес представляют данные о способности холинэстераз гидролизовать различные холиновые эфиры, отличающиеся друг от друга длиной цепи ацильного остатка (Nachmansohn, Rothenberg, 1944, 1945; Myers, 1953; Sturge, Whittaker, 1950; Mounter, Cheatham, 1963, и др.). Оказалось, что для ложной холинэстеразы скорость гидролиза возрастает в ряду ацетил<пропионил<бутирил, тогда как для истинной холинэстеразы наблюдались обратные отношения: удлинение ацильного остатка сопровождалось выраженным снижением скорости гидролиза и бутирилхолин, как правило, совсем не разрушался под действием фермента. Необходимо отметить, что количественные различия в скорости гидролиза разных эфиров холина истинной холинэстеразой в значительной мере зависят от происхождения фермента. Так, фермент, полученный из электрической ткани Torpedo, гидролизует пропионилхолин в три раза



медленнее, чем ацетилхолин, а холинэстераза из электрического органа *Electrophorus electricus* расщепляет оба эфира с одинаковой скоростью. Последний из названных ферментов совершенно не действует на бутирилхолин, тогда как холинэстераза из хвостовой мышцы *Lebistes* разрушает бутирилхолин со скоростью лишь в 4 раза меньшей, чем ацетилхолин.

Хейльброн (Heilbronn, 1959) исследовала действие истинной и ложной холинэстераз на различные эфиры тioxолина и показала, что здесь существуют те же закономерности, которые наблюдались при изучении холиновых эфиров: для истинной холинэстеразы скорость гидролиза эфиров уменьшалась с удлинением цепи кислотного остатка, для ложной холинэстеразы наблюдались обратные отношения. Ложная холинэстераза расщепляла ацетилтиохолин быстрее, чем ацетилхолин, а истинная холинэстераза гидролизовала оба эфира примерно с одинаковой скоростью. Эти результаты противоречат данным Бергмана (Bergmann, 1958), который нашел, что и истинная холинэстераза расщепляет ацетилтиохолин в 5 раз быстрее, чем ацетилхолин.

Как уже отмечалось, важной особенностью истинной холинэстеразы является ее способность тормозиться избытком ацетилхолина. Незнание этого обстоятельства нередко приводило к ошибочным выводам о субстратной специфичности холинэстеразы. Так, оказалось, что при концентрации, оптимальной для ацетилхолина, триацетин гидролизует ферментом очень медленно. Однако, повышая концентрацию субстрата, можно создать такие условия, при которых гидролиз ацетилхолина окажется сильно подавленным и триацетин будет расщепляться быстрее, чем ацетилхолин. Если ограничить исследования только такими высокими концентрациями субстрата, то создается ошибочное представление, будто бы триацетин обладает большим сродством к ферменту, чем ацетилхолин.

Аугустинссон (Augustinsson, 1948, 1949) показал, что не только для ацетилхолина, но и для других холиновых эфиров нужна оптимальная концентрация для проявления максимальной активности истинной холинэстеразы. Она оказалась одинаковой для разных эфиров и для фермента разного происхождения (электрическая ткань рыб, головной ганглий кальмара, мозг млекопитающих, поперечнополосатая мышца и др.) и составляла приблизительно  $3 \cdot 10^{-3}$  М. В случае ложной холинэстеразы увеличение концентрации субстрата сопровождалось равномерным повышением скорости гидролиза и никакого оптимума концентрации субстрата не отмечалось.

На рис. 4 показаны важнейшие зависимости, определяющие субстратную специфичность истинной и ложной холинэстеразы. Из рисунка видно, что истинная холинэстераза гидролизует ацетилхолин лучше других холиновых эфиров, тогда как наилуч-



шим субстратом для ложной холинэстеразы служит бутирилхолин. Оптимум концентрации субстрата наблюдается только в действии истинной холинэстеразы и характерен лишь для холиновых эфиров; он отсутствует при использовании в качестве субстрата триацетина.

Изменение структуры ацетилхолина существенно влияет на способность полученных производных расщепляться под дей-

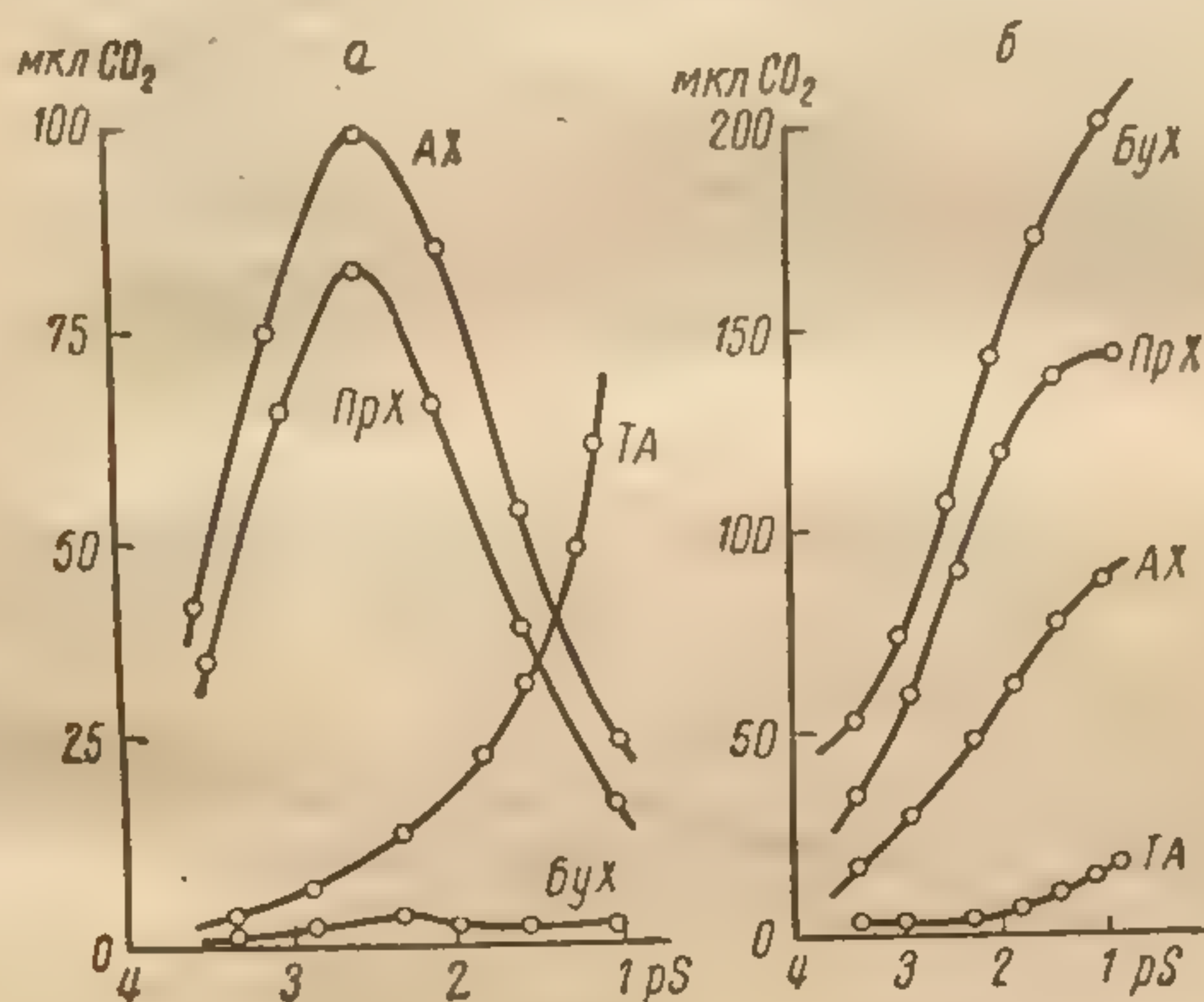


Рис. 4. Зависимость активности истинной (а) и ложной (б) холинэстеразы от природы и концентрации субстрата (Nachmansohn, 1959).

На оси абсцисс — отрицательный логарифм молярной концентрации субстратов ( $pS$ ); на оси ординат — активность холинэстеразы (в мкл  $CO_2$  за 30 мин). АХ — ацетилхолин; ПрХ — пропионилхолин; БуХ — бутирилхолин; ТА — триацетин.

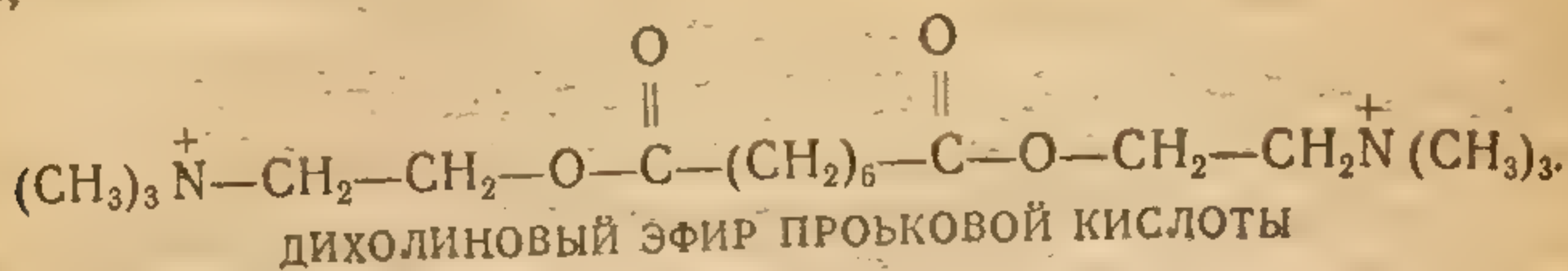
ствием холинэстеразы. Так, введение двойной связи в  $\alpha$ — $\beta$ -положение снижало скорость гидролиза под действием обоих ферментов; двойная связь в другом положении мало влияла на гидролизуюемость субстрата. Снижение способности к гидролизу наблюдалось также при введении алкильных групп в  $\alpha$ -положение насыщенных и ненасыщенных эфиров (Sekul et al., 1962).

На производных бензоилхолина было установлено, что введение в о-положение бензольного кольца таких заместителей, как  $-CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-Cl$ ,  $-Br$ ,  $-I$ ,  $-NO_2$ , резко снижает способность полученных соединений гидролизываться ложной холинэстеразой и усиливает их тормозящее действие на истинную холинэстеразу. Относительная скорость щелочного гидролиза при этом изменялась незначительно (Thomas a. Buckley, 1962).

Ложная холинэстераза избирательно гидролизует дихолиновые эфиры некоторых высших дикарбоновых кислот — проб-



ковой, себаценовой и др. Эти эфиры расщепляются даже быстрее, чем ацетилхолин (Ф. В. Певзнер, 1955):



Известно, что холинэстеразы обладают способностью гидролизовать и нехолиновые эфиры. И в этом случае строение эфиров существенно сказывается на скорости гидролиза (Adams, Whittaker, 1949, 1950). На рис. 5 показана зависимость скорости ферментативного гидролиза нехолиновых эфиров от длины алкильной и ацильной части их молекулы. Изменение длины алкильной цепи дает одинаковый эффект для холинэстераз обоого типа: скорость гидролиза увеличивается с увеличением числа углеродных атомов в алкильной части до 4, а затем снижается. Таким образом, -бутилацетат оказался оптимальным субстратом как для истинной, так и для ложной холинэстеразы. В отличие от этого, изменение длины ацильного остатка при неизменных размерах алкильной части молекулы по-разному сказывалось на их способности расщепляться разными холинэстеразами. Для истинной холинэстеразы наблюдался резко выраженный оптимум в случае двууглеродной ацильной части (ацетат), а при взаимодействии с бутиратом скорость гидролиза практически снижалась до нуля; наилучшим субстратом для ложной холинэстеразы служил бутират. Следовательно, здесь имели место те же закономерности, что и при использовании в качестве субстратов холиновых эфиров. Эти данные были в дальнейшем подтверждены на препарате очищенной холинэстеразы из плазмы человека. Оказалось, что такой препарат гидролизует бутираты холина, фенила и индоксила с большей скоростью, чем соответствующие пропионаты и ацетаты (Augustinsson, Ekedahl, 1962).

Увеличение гидролиземости наблюдалось при разветвлении углеродной цепи в конце алкильного остатка эфира. На-

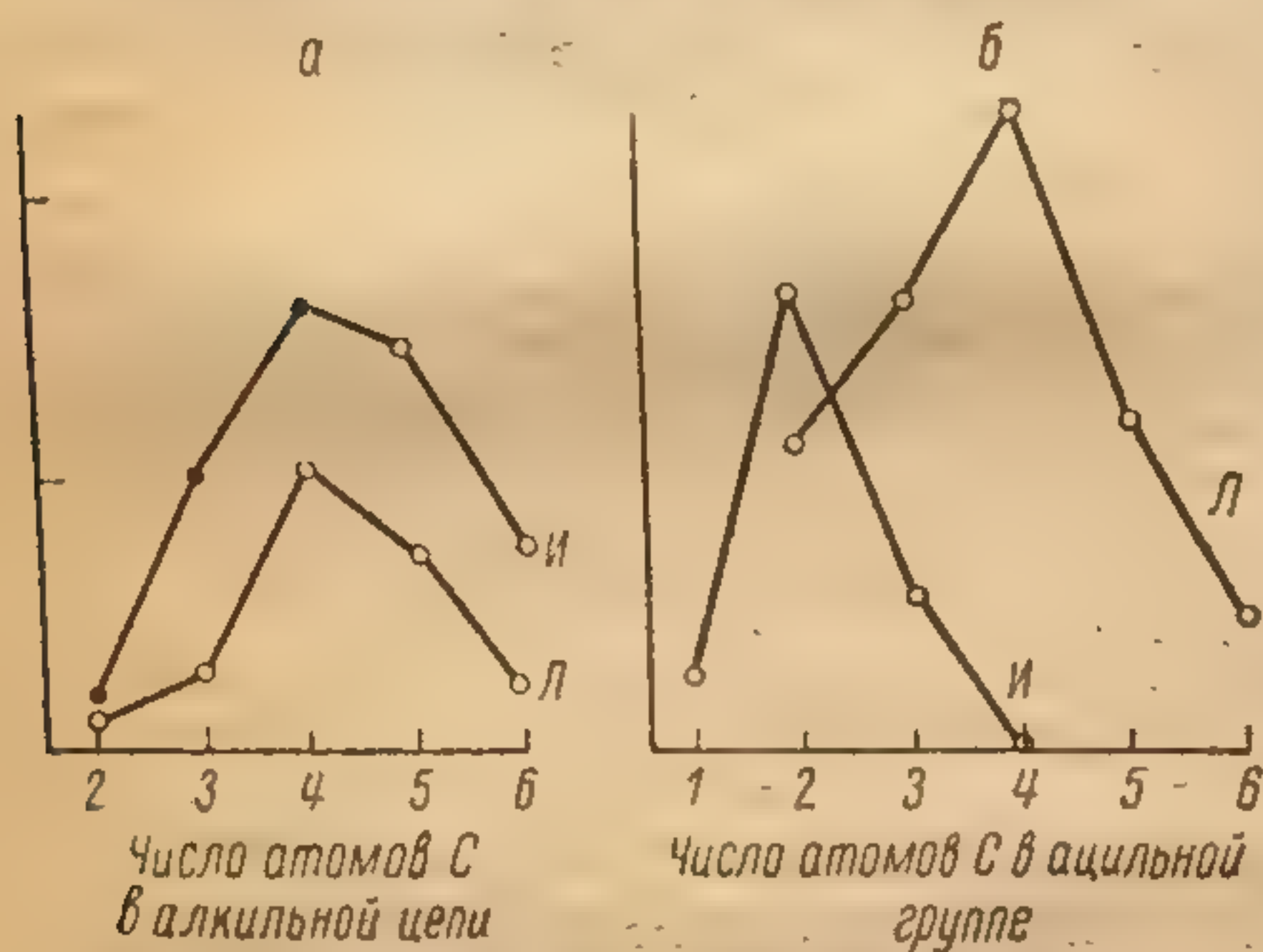


Рис. 5. Зависимость скорости ферментативного гидролиза нехолиновых эфиров от длины алкильной (а) и ацильной (б) части их молекулы (Adams, 1949).

И — истинная холинэстераза; Л — ложная холинэстераза.

лучшим субстратом  
оказался ацетат  
хололина (ацетат)

Ацетилхолин

Оотносительная скорость  
холинэстеразы

название

Ацетилхолин

Пропионилхолин

Бутирилхолин

Валерилхолин

А.этилхолин

Б.тирилхолин

А.этил-β-метилхолин

Б.этилхолин

Этилхолин

Пропилацетат

Бутилацетат

Г.этилхолин

Изоамилацетат

3,3-диметилбутилацетат

2-этил-4-тиацетат

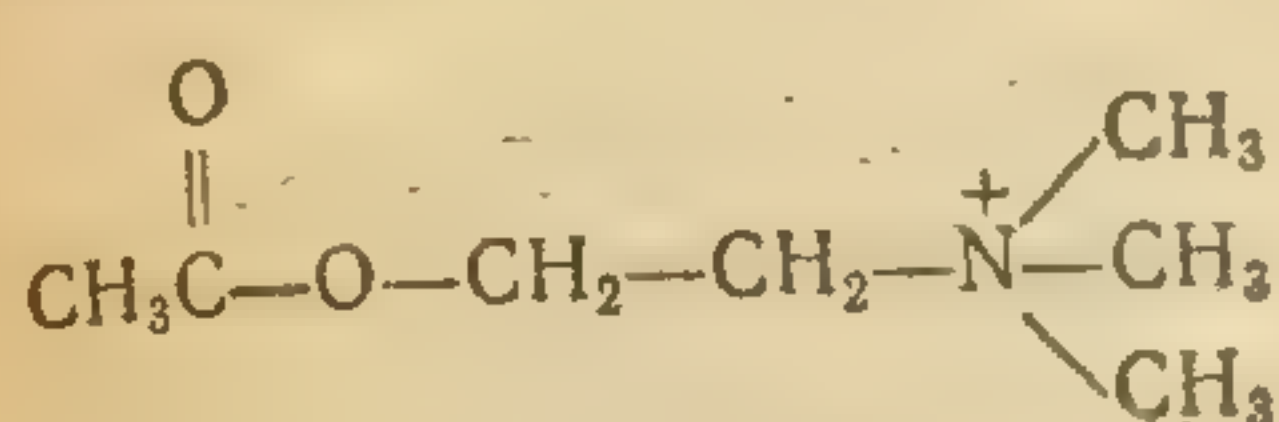
Т.этилхолин

Было установлено

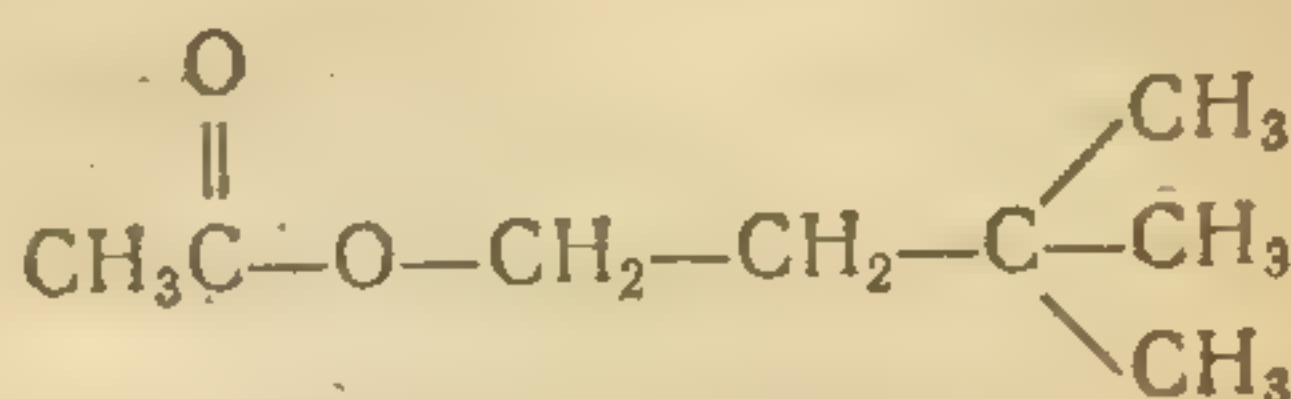
некоторые аром



лучшим субстратом из исследованных соединений этого типа оказался 3,3-диметилбутилацетат, который можно рассматривать как углеродный аналог ацетилхолина. Скорость его гидролиза была лишь немногим меньше скорости разрушения ацетилхолина (около 60%). Этот факт говорит о выраженном срод-



АЦЕТИЛХОЛИН



3,3-ДИМЕТИЛБУТИЛАЦЕТАТ

стве активной поверхности холинэстеразы к метильным группам.

Таблица 6

Относительная скорость гидролиза различных субстратов истинной и ложной холинэстеразой (по данным разных авторов)

Субстрат		Истинная холинэстераза	Ложная холинэстераза
название	формула		
Ацетилхолин	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	100	100
Пропионилхолин	$\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	78	145
Бутирилхолин	$\text{C}_3\text{H}_7\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	2,3	216
Валерилхолин	$\text{C}_4\text{H}_9\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3,3	145
Ацетилтиохолин	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	149	430
Бутирилтиохолин	$\text{C}_3\text{H}_7\text{C}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0	590
Ацетил-β-метилхолин	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	18	0
Бензоилхолин	$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0	67
Этилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$	2	1
Пропилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_3\text{H}_7$	9	3
Бутилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_4\text{H}_9$	16	10
Гексилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_{13}$	7	2
Изоамилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	24	27
3,3-диметилбутилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$	60	35
2-хлорэтилацетат	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	37	10
Триацетин	$[\text{CH}_3\text{C}(\text{O})]_3\text{-глицерил}$	42	14

Было установлено, что обе холинэстеразы легко гидролизуют некоторые ароматические эфиры, такие, как фенилацетат и



п-нитрофенилацетат. Несколько труднее осуществляется ферментативное расщепление триглицеридов, причем истинная холинэстераза легче других разрушает триацетин, а ложная — трибутирин.

Заслуживает внимания то обстоятельство, что холинэстераза обладает выраженной стереоспецифичностью. Еще в 1938 г. Глик (Glick) показал, что ферментативному расщеплению подвергается только правовращающий изомер ацетил-β-метилхолина. Хоскин и Трик (Hoskin, Trick, 1955) подтвердили эти данные. Недавно Хоскин (Hoskin, 1963) показал, что L-изомер ацетил-β-метилхолина тормозит активность как ложной, так и истинной холинэстеразы.

Аммон и Мейер (Ammon, Meyer, 1959) исследовали стереоспецифичность истинной и ложной холинэстеразы путем изучения их действия на D- и L-изомеры холинового эфира миндальной кислоты. На значительном числе препаратов фермента было убедительно показано, что ложная холинэстераза быстрее гидролизует L-изомер, а истинная — D-изомер.

В табл. 6 представлены некоторые данные об относительной скорости гидролиза различных субстратов холинэстеразой разного происхождения.

### КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Холинэстераза принадлежит к числу чрезвычайно активных ферментов. Как известно, мерой каталитической эффективности фермента является так называемое «число оборотов» или, точнее, «молекулярная активность», т. е. величина, показывающая, сколько молекул субстрата способна переработать одна молекула фермента в единицу времени. Для истинной холинэстеразы эта величина впервые была определена Ротенбергом и Нахманзоном (Rothenbegr, Nachmansohn, 1947). Авторы выделили фермент из электрической ткани и очистили его фракционированным осаждением сернокислым аммонием. Аналитическими определениями с помощью ультрацентрифуги и электрофореза было установлено, что в полученном растворе содержится один-единственный белковый компонент. 1 мг этого белка был в состоянии в течение часа расщепить 75 г ацетилхолина. Молекулярный вес данного препарата фермента был равен  $3 \cdot 10^6$ . Рассчитанная для этой величины молекулярная активность холинэстеразы составляла  $3 \cdot 10^7$ , т. е. 30 млн. в минуту.

Это исключительно высокое значение было получено на основании предположения, что каждая молекула фермента содержит только один активный центр. На самом деле в молекуле холинэстеразы может содержаться 30—50 активных центров.



В самое последнее время было показано (Lawler, 1963), что холинэстераза электрического органа в растворе представляет собой полимер с молекулярным весом более 30 млн. Мономер белка холинэстеразы имеет молекулярный вес около 330 000. В дальнейших исследованиях определение числа оборотов производилось в расчете не на молекулу ферментного белка, а на один активный центр, т. е., по существу, определялась «активность каталитического центра» (АКЦ). В соответствии с рекомендацией комиссии по ферментам (Классификация и номенклатура ферментов, 1962), мы будем пользоваться термином АКЦ вместо устаревшего и недостаточно точного названия «число оборотов». Естественно, что для ферментов, которые содержат несколько активных центров в молекуле, значение АКЦ будет ниже величины молекулярной активности, так как оно показывает, сколько молекул субстрата превращается в одну минуту одним каталитическим центром, а не целой молекулой фермента.

Мичел и Кроп (Michel, Krop, 1951) при исследовании аналогичного препарата холинэстеразы использовали необратимый ингибитор — диизопропилфторфосфат, о котором известно, что он избирательно фосфорилирует активные центры фермента. Они обрабатывали препарат холинэстеразы радиоактивным диизопропилфторфосфатом, затем осаждали белок, тщательно отмывали осадок от непрореагировавшего ингибитора и по радиоактивности осадка судили о числе активных центров. Вычисленная таким способом АКЦ составляла  $7,2 \cdot 10^5$ . Примененный этими авторами метод определения таит в себе возможность серьезной ошибки, зависящей от того, что диизопропилфторфосфат как мощный фосфорилирующий агент может фосфорилировать не только холинэстеразу, но и другие белки, а также другие группы, помимо активных центров, в белке холинэстеразы. В данном исследовании эта возможность была в известной мере предотвращена тем, что авторы определили фосфорилирование в присутствии ацетилхолина, который защищает активные центры фермента от действия ингибитора. Оказалось, что в этих условиях радиоактивность белкового осадка была очень небольшой.

Коэн и Варринга (Cohen, Warringa, 1953b) модифицировали этот метод и, работая с холинэстеразой эритроцитов, использовали бутирилхолин в качестве вещества, защищающего активные центры от фосфорилирования. Они обрабатывали препарат фермента бутирилхолином и немеченым диизопропилфторфосфатом, затем освобождали белок от избытка ингибитора и от бутирилхолина с помощью диализа и воздействовали радиоактивным диизопропилфторфосфатом. При этом они полагали, что даже если другие группировки будут фосфорилироваться, то



радиоактивный фосфор окажется связанным только с активными центрами. Найденная ими АКЦ составляла  $3 \cdot 10^5$ .

С помощью еще более усовершенствованного метода, основанного на предварительном угнетении фермента специфическим ингибитором — диэтоксифосфорилтиохолином, с последующей реактивацией пиридинальдоксимом и повторным угнетением радиоактивным тетраэтилпирофосфатом, было установлено, что холинэстераза из электрического органа имеет АКЦ  $6 \cdot 10^5$ — $10 \cdot 10^5$  (Lowler, 1961).

Вильсон и Харрисон (Wilson, Harrison, 1961) предложили новый метод определения АКЦ, основанный на применении диметилкарбамилфторида. Это вещество, известное как ингибитор холинэстеразы, оказалось также очень слабым субстратом ее действия. Его реакция с ферментом протекала настолько медленно, что можно было надежно определить константы скоростей отдельных этапов процесса и на основании кинетических данных определить АКЦ. Для холинэстеразы из электрического органа она оказалась равной  $7,4 \cdot 10^5$ .

И. Л. Брик и В. А. Яковлев (1962а, б) применили для титрования активных центров холинэстеразы специфический ингибитор Гд-42, представляющий собой метилсульфометилат О-этил-S-β-меркаптоэтилового эфира метилфосфиновой кислоты. Они исследовали холинэстеразу мозга различных животных и для разных видов получили совпадающие значения АКЦ. Так, для фермента мозга белых мышей и лягушек эта величина составляла около  $1 \cdot 10^5$ , а для холинэстеразы головы мясных мух —  $0,8 \cdot 10^5$ .

Несколько более низкие значения, полученные этими авторами, могли зависеть от того, что исследованию подвергался неочищенный гомогенат мозга и, следовательно, могла иметь место некоторая потеря ингибитора в результате фосфорилирования других белков.

Из приведенных данных видно, что разные авторы, пользуясь различными методами, получили близко совпадающие величины АКЦ для истинной холинэстеразы. В большинстве случаев она составляла  $7 \cdot 10^5$  —  $9 \cdot 10^5$ . Это значит, что один активный центр фермента в одну минуту обеспечивает гидролиз около миллиона молекул ацетилхолина. Из этой величины легко подсчитать, что гидролиз одной молекулы ацетилхолина протекает за 60—90 мсекунд, т. е. с очень большой скоростью, вполне соизмеримой со скоростями передачи нервных импульсов в синапсах.

Ложная холинэстераза характеризуется несколько меньшей каталитической эффективностью. По данным разных авторов, АКЦ холинэстеразы лошадиной сыворотки составляет  $5 \cdot 10^4$ — $9 \cdot 10^4$  (Easson, Stedman 1936; Cohen et al., 1955а, б; Jansz, Cohen, 1962).



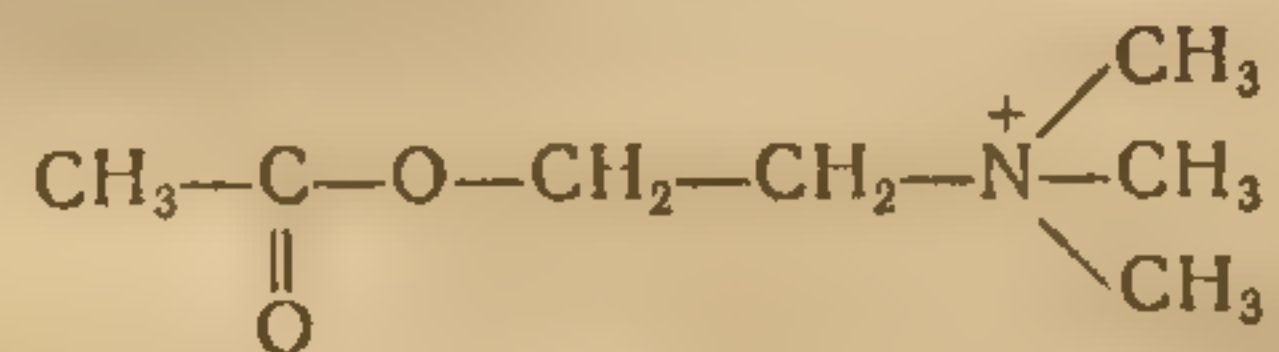
## СТРОЕНИЕ АКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА АЦЕТИЛХОЛИНА

Осуществление столь мощного каталитического эффекта, какой свойствен холинэстеразе, возможно лишь при условии наличия в молекуле этого фермента определенных участков (активных центров), обладающих исключительно выраженной реакционной способностью по отношению к ацетилхолину.

Поиски этих участков и попытки выяснения их химической природы наталкиваются на многие трудности, главной из которых является то обстоятельство, что холинэстераза относится к протеинам — простым белкам и, следовательно, не содержит в своем составе никаких простетических групп небелкового характера, которые могли бы быть отделены от белка и исследованы в чистом виде. При гидролизе белка холинэстеразы, как кислотном, так и ферментативном (под действием протеолитических ферментов), были выделены только аминокислоты и низкомолекулярные пептиды (Cohen et. al., 1955). Известно также, что холинэстераза не относится к так называемым сульфгидрильным ферментам, т. е. ее активность не зависит от наличия свободных SH-групп и в состав ее активного центра не входят металлы (Mounter, Whittaker, 1953; Wilson, Cabib, 1954; Hargreaves, 1955).

С другой стороны, по мере постепенного разрушения холинэстеразы ее ферментативная активность снижается (Bergmann, Segal, 1955). Это значит, что каталитический эффект холинэстеразы, ее специфическая реакционная способность по отношению к ацетилхолину зависит от всего комплекса структурных особенностей сложной белковой молекулы и, следовательно, расшифрование химической природы активной поверхности холинэстеразы возможно лишь при изучении целого, неразрушенного фермента, т. е. почти исключительно непрямым путем.

Специфическим субстратом холинэстеразы является ацетилхолин, который под действием фермента гидролизует с образованием холина и уксусной кислоты:

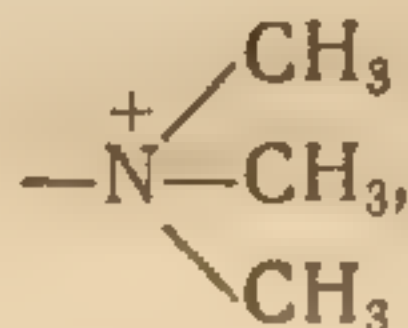


В то же время известно, что холинэстераза способна, хотя и с меньшей скоростью, катализировать гидролиз других сложных эфиров, а многие так называемые неспецифические эстеразы разрушают ацетилхолин.

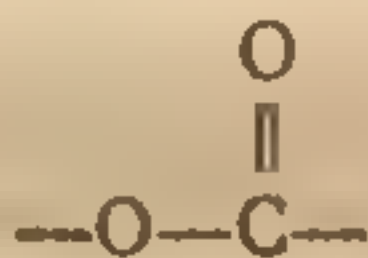


## ДВОЙСТВЕННАЯ ПРИРОДА АКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

При рассмотрении структуры ацетилхолина нетрудно заметить два характерных участка в его молекуле, две атомные группировки, которые определяют его важнейшие свойства. Это положительно заряженный атом азота с тремя метильными группами:



так называемая катионная головка и сложноэфирная группа:



Логично предположить, что и на активной поверхности холинэстеразы должны существовать два участка, соответствующих этим группировкам и расположенных на таком же расстоянии друг от друга, как и названные группы в молекуле ацетилхолина. Существование таких участков на активной поверхности фермента было показано экспериментально. Они получили названия «анионный центр» (соответствующий катионной головке ацетилхолина) и «эстеразный центр» (соответствующий сложноэфирной группе ацетилхолина).

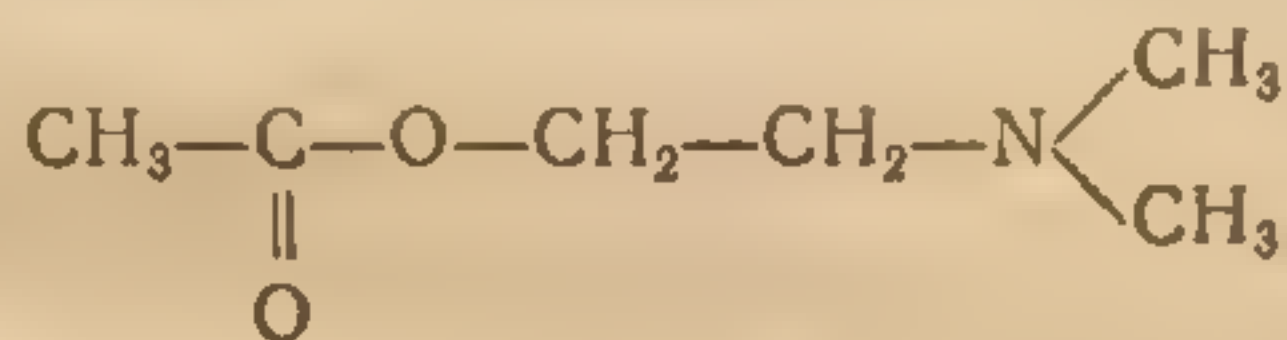
О наличии анионного центра, т. е. отрицательно заряженной области, которая электростатически притягивает к себе положительно заряженную катионную головку субстрата, свидетельствуют опыты, в которых изучалось влияние рН на способность некоторых ингибиторов тормозить активность фермента и на способность холинэстеразы гидролизовать различные субстраты (Wilson, Bergmann, 1950a, б; Wilson, 1952).

Среди обратимых ингибиторов холинэстеразы широко известны два вещества: эзерин (физостигмин) и прозерин (про-стигмин), которые обладают сравнимой эффективностью и имеют некоторые черты сходства в химическом строении. Их структура и свойства более подробно будут описаны ниже. Главное различие между ними, интересующее нас сейчас, состоит в том, что прозерин является четвертичным аммониевым соединением, а эзерин представляет собой третичный амин. Из этого следует, что прозерин при всех значениях рН находится в ионной форме — в виде положительно заряженного катиона, тогда как количество ионной формы эзерина существенно меняется при изменении рН. Степень ионизации эзерина при данном рН определяется константой его диссоциации (рК), которая равна 8,1. Это значит, что при рН = 8,1 он ионизирован на половину; при уменьшении рН, т. е. при сдвиге реакции среды в



кислую сторону, его ионизация возрастает, и практически можно считать, что при  $pH = 6,0$  весь эзерин находится в ионной форме; при увеличении  $pH$  количество ионной формы, наоборот, уменьшается и при  $pH$  выше 10 почти полностью исчезает. В полном соответствии с этими свойствами обоих соединений оказалось, что  $pH$  среды совершенно не влияет на ингибиторную способность прозерина, тогда как у эзерина с увеличением  $pH$  тормозящее действие резко снижается. Из этого следует, что для подавления холинэстеразы ингибиторы данного типа обязательно должны находиться в ионной форме, т. е. располагать свободным положительным зарядом, что легче всего объяснить существованием на поверхности фермента соответствующего отрицательного заряда.

Совершенно аналогичные результаты были получены при изучении влияния  $pH$  на гидролиземость различных субстратов. В качестве объектов исследования были выбраны ацетилхолин и его третичный аналог — диметиламиноэтилацетат:



Между этими веществами существуют различия, очень напоминающие те, которые были только что описаны для прозерина и эзерина. Ацетилхолин является четвертичным соединением и полностью ионизирован при любом значении  $pH$ ; диметиламиноэтилацетат — третичный амин с константой диссоциации ( $pK$ ), равной приблизительно 8,3. Следовательно, при  $pH$  ниже 8,3 он существует преимущественно в катионной форме, а при  $pH$  выше 8,3 — главным образом в виде незаряженной молекулы. При изучении влияния  $pH$  на расщепление этих субстратов холинэстеразой необходимо было учитывать, что и гидролиз аце-

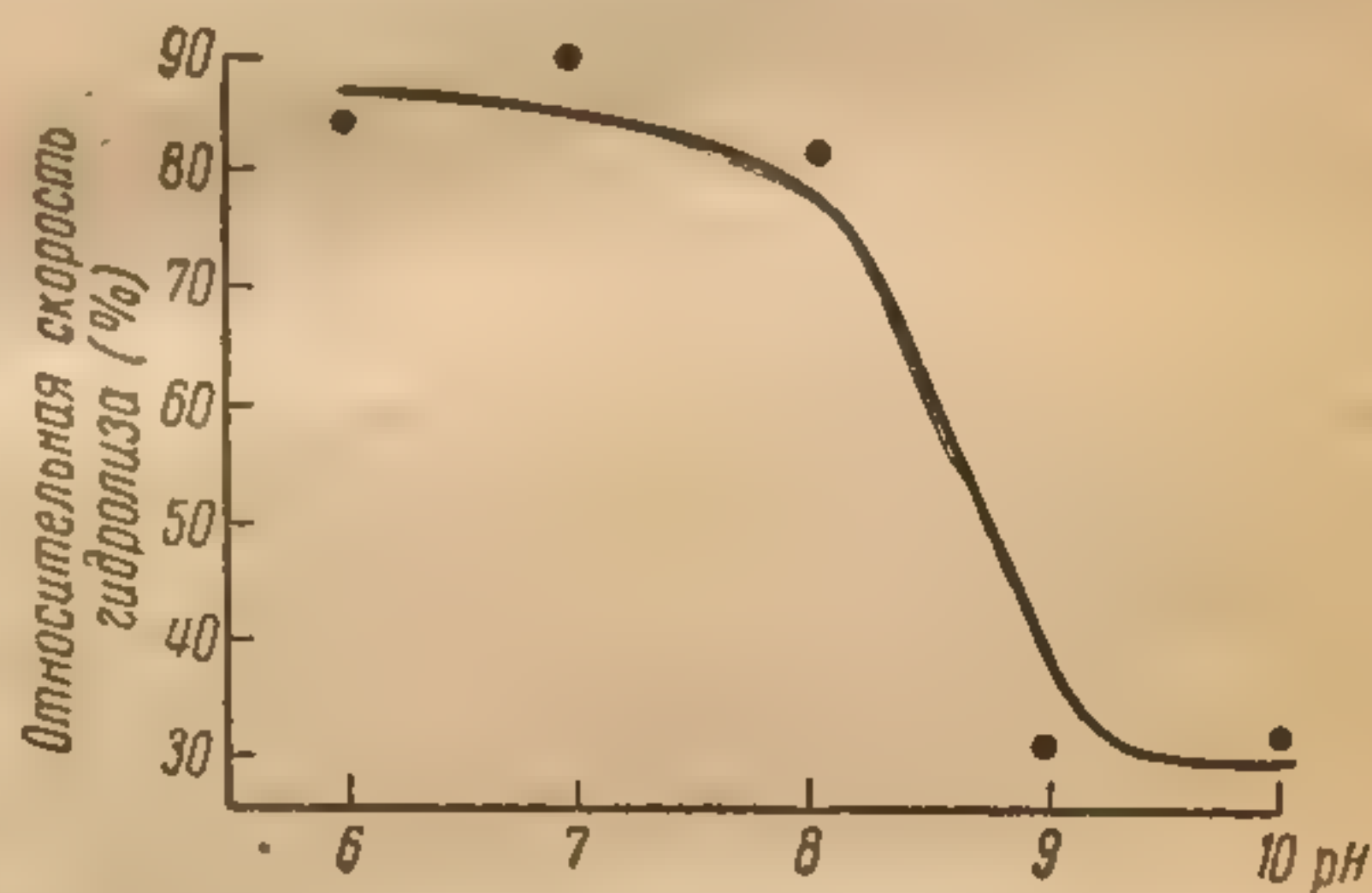


Рис. 6. Влияние  $pH$  на скорость гидролиза диметиламиноэтилацетата (Nachmansohn, 1959).

тилхолина зависит от кислотности среды, что связано с изменением свойств эстеразного центра (см. ниже). Поэтому на рис. 6, где представлены результаты этих опытов, скорость гидролиза диметиламиноэтилацетата выражена не в абсолютных единицах, а в относительных, в виде % к скорости разложения ацетилхолина при каждом данном  $pH$ . Из рисунка



видно, что диметиламиноэтилацетат разрушается с большой скоростью при рН ниже 8, т. е. тогда, когда он находится преимущественно в виде положительно заряженного иона, а при увеличении рН от 8 до 9 скорость гидролиза быстро и резко снижается, что строго коррелирует с уменьшением количества ионной формы субстрата. И этот факт однозначно указывает на наличие в холинэстеразе отрицательно заряженного участка, который притягивает к себе катионную головку субстрата и тем самым способствует образованию фермент-субстратного комплекса.

При более внимательном рассмотрении результатов этих исследований видно, что даже в полностью неионизированном виде диметиламиноэтилацетат сохраняет некоторую достаточно выраженную способность гидролизироваться холинэстеразой (см. рис. 6). Точно так же и тормозящее действие эзерина при высоких значениях рН не исчезает полностью. Значит, названные субстрат и ингибитор обладают способностью реагировать не только с анионным, но и с эстеразным центром фермента. Это обстоятельство вносит некоторые трудности в интерпретацию данных, полученных на основе изучения влияния рН, так как известно (см. ниже), что изменения рН оказывают существенное воздействие и на функцию эстеразного центра. Кроме того, необходимо помнить, что в изложенных выше работах сделано

Таблица 7. молчаливое допущение, что структура анионного центра не меняется с изменением рН, а это, по-видимому, далеко не всегда соответствует действительности.

Торможение холинэстеразы производными аммония (Wilson, 1952)	
Ингибитор	Молярная концентрация, вызывающая 50%-ное торможение
$\text{CH}_3\text{NH}_3^+$	0,7
$(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+$	0,12
$(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$	0,015
$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$	0,018

в образовании обусловленных ими связей участвует большое число атомов. При взаимодействии катионной головки ацетилхолина с анионным центром холинэстеразы возникновение достаточного количества таких связей обусловлено наличием метильных групп. Это было убедительно показано Вильсоном (Wilson, 1952), который исследовал тормозящее действие на холинэстеразу производных аммония, содержащих различное число метильных групп. Результаты этих опытов представлены в табл. 7.



Сходные данные были получены для производных оксиэтил-аммония (аналогов холина).

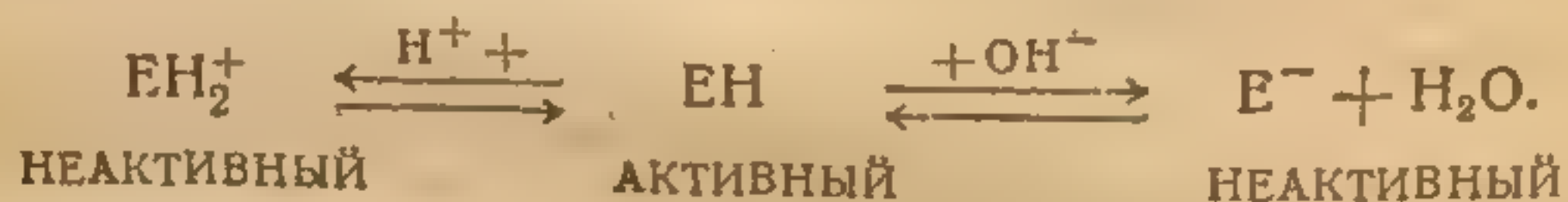
Из таблицы видно, что введение каждой дополнительной группы в молекулу ингибитора такого типа повышает сродство соединения к ферменту до тех пор, пока число метильных групп не достигает трех. Введение четвертой метильной группы уже не оказывает влияния. Легко убедиться в том, что все четыре соединения, перечисленные в таблице, не отличаются друг от друга по заряду, и следовательно, разница в тормозящей активности может зависеть только от того, что метильные группы образуют с соответствующими участками фермента дополнительные связи за счет сил ван-дер-Ваальса. Как уже отмечалось, эти силы действуют лишь на близком расстоянии, и поэтому можно думать, что расположение атомных групп вокруг отрицательного заряда в анионном центре обеспечивает такую структуру, которая очень точно соответствует строению катионной головки ацетилхолина, или другими словами: катионная головка служит как бы «молекулярным дополнением» к анионному центру. Из таблицы также видно, что это соответствие полностью обеспечивается тремя связанными с азотом метильными группами; увеличение числа метильных групп до четырех не приводит к созданию дополнительных связей. О том, что такая структура (три метильные группы, расположенные вокруг одного атома) играет существенную роль во взаимодействии с холинэстеразой, говорит и уже упоминавшийся выше факт: выраженная способность фермента гидролизовать 3,3-диметилбутилацетат, который можно рассматривать как углеродный аналог ацетилхолина, лишенный характерного для ацетилхолина положительного заряда.

Приведенные выше данные могут служить достаточным основанием для того, чтобы признать существование в холинэстеразе анионного центра, который играет ориентирующую роль: способствует сближению субстрата с ферментом и обеспечивает нужную ориентацию молекулы субстрата на активной поверхности фермента.

На определенном расстоянии от анионного центра должен существовать другой, эстеразный центр, который взаимодействует со сложноэфирной связью и обуславливает ее разрыв в ходе гидролиза. Об этом свидетельствует прежде всего способность холинэстеразы гидролизовать такие сложные эфиры, которые совершенно лишены катионной головки и, следовательно, не могут реагировать с анионным центром. Еще более убедительные данные, свидетельствующие не только о существовании эстеразного центра, но и проливающие некоторый свет на его свойства, были получены при изучении действия фосфорорганических ингибиторов на холинэстеразу. Многие из этих соединений вообще не способны к ионизации, и так как они



лишены катионной структуры и, следовательно, не могут реагировать с анионным центром, то их удивительную способность подавлять активность холинэстеразы в ничтожных концентрациях можно объяснить только их избирательным действием на эстеразный центр. Инактивирующая эффективность некоторых из этих веществ, например тетраэтилпирофосфата, зависит от рН и имеет четко выраженный оптимум при рН = 8 (Wilson, Bergmann, 1950). Так как изменение кислотности не может повлиять на строение тетраэтилпирофосфата, то находимые различия в степени торможения при различном рН следует объяснить действием рН на эстеразный центр. Исходя из этих данных, а также из того, что и гидролиз ацетилхолина холинэстеразой характеризуется рН-оптимумом в области 7,5—9,0, Вильсон и Бергман высказали предположение, что эстеразный центр представляет собой комбинацию двух групп: кислотной и основной, диссоциация которых с изменением рН изменяется во взаимно противоположном направлении. Если эту комбинацию групп обозначить Е, то активному эстеразному центру (в оптимальной области рН) может быть приписано строение ЕН, причем можно считать, что в этих условиях его электрический заряд равен нулю. При сдвиге рН в кислую сторону он приобретает протон и превращается в неактивную форму ЕН<sub>2</sub><sup>+</sup>; при сдвиге рН в щелочную сторону от оптимума он, наоборот, теряет протон и тоже превращается в неактивную форму, но имеющую другое строение: Е<sup>-</sup>. Схематически эти превращения, связанные с изменением диссоциации кислотной и основной групп, могут быть представлены в следующем виде:

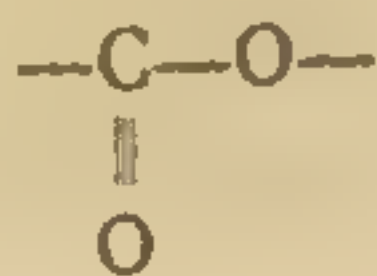


Формы ЕН<sub>2</sub><sup>+</sup> и Е<sup>-</sup> — либо совсем не образуют комплексов с субстратом, либо эти комплексы являются неактивными. Эти представления в дальнейшем были развиты и дополнены многими исследователями. Были разработаны математические и экспериментальные методы, позволившие определить величины рК кислотной и основной групп эстеразного центра, т. е. количественно охарактеризовать их способность к ионизации. Найденные величины оказались близкими для ложной и истинной холинэстеразы разного происхождения и составляли для рК основной группы 6,2—6,7, а для рК кислотной группы 9,3—10,3 (Wilson, Bergmann, 1950a; Hase, 1952; Gutfreund, 1955; Laidler, 1955; Bergmann et al., 1956).

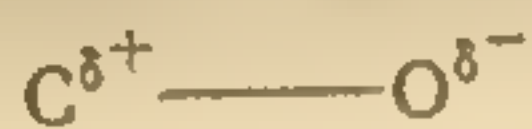
На основании современных теорий щелочного катализа гидролиза сложных эфиров можно считать, что функция эстеразного центра состоит во взаимодействии основной (нуклеофиль-



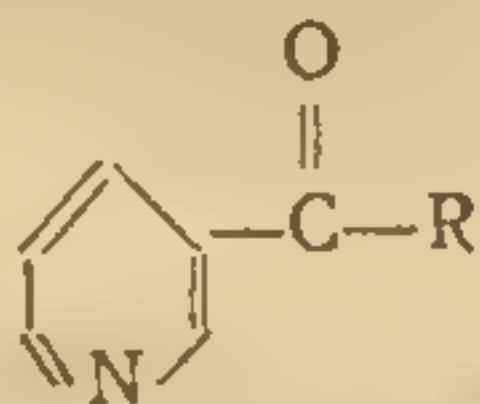
ной) группы с карбонильным углеродом сложноэфирной связи в молекуле субстрата:



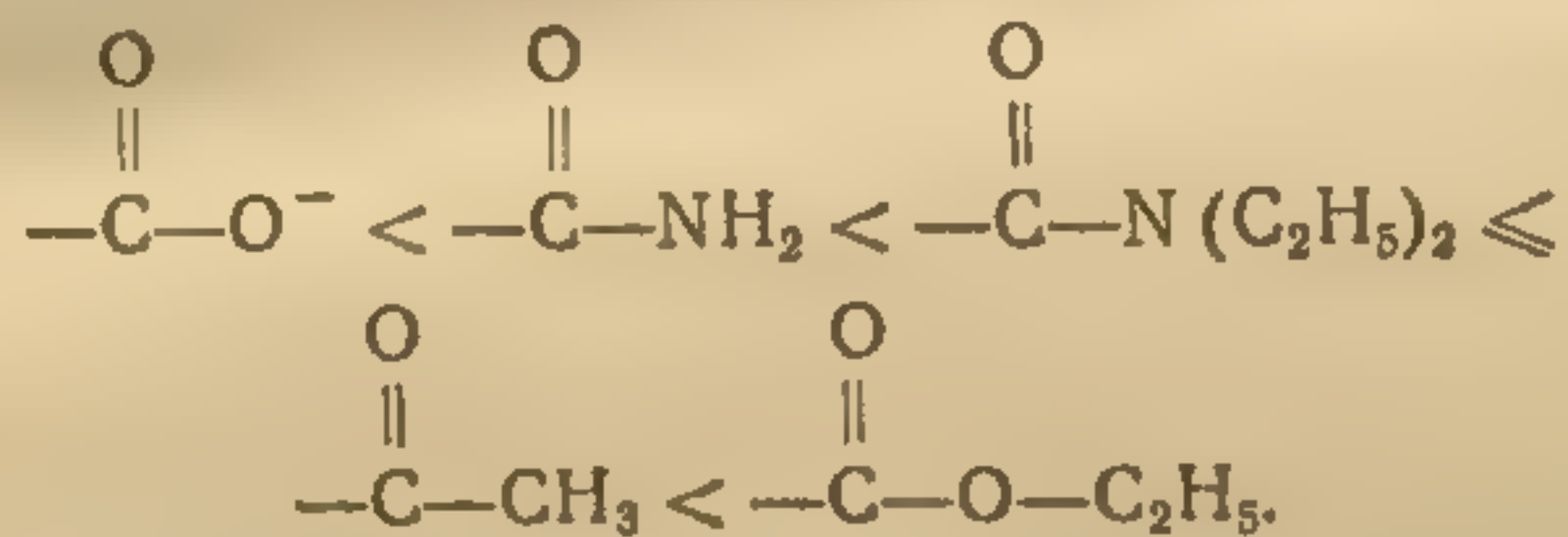
Возможность такого взаимодействия обеспечивается тем, что связь между углеродом и кислородом в карбонильной группе ( $\text{C}=\text{O}$ ) поляризована, т. е. заряды между этими атомами распределены неравномерно; электроны смещены в сторону кислорода, благодаря чему атом кислорода приобретает некоторый отрицательный заряд, а атом углерода — некоторый положительный заряд, т. е. становится электрофильным:



Значение электрофильности углерода для его реакции с эстеразным центром холинэстеразы было очень убедительно продемонстрировано в опытах Бергмана и др. (Bergmann et al., 1950), исследовавших тормозящее действие на холинэстеразу различных производных никотиновой кислоты:



Были выбраны такие заместители при карбонильной группе, которые существенно меняли электрофильность углеродного атома. Оказалось, что тормозящее действие и электрофильность изменялись совершенно параллельно и повышались в ряду:



Аналогичные данные были получены при использовании субстратов холинэстеразы, обладающих различной электрофильностью карбонильного углерода (Wilson, 1952).

Все изложенное дает основание в следующем виде схематически представить строение активной поверхности холинэстеразы (рис. 7). Из рисунка видно, что комплекс фермента с субстратом образуется за счет связи основной (нуклеофильной) группы эстеразного центра с карбонильным углеродом ацетилхолина, с одной стороны, и за счет комбинации электростатических и ван-дер-ваальсовых сил, связывающих анионный центр с катионной головкой ацетилхолина, — с другой.



Вопрос о том, участвуют ли в образовании этого комплекса водородные связи, остается до настоящего времени открытым. Вильсон (Wilson, 1952) отрицает участие водородных связей на том основании, что холин и триметиламинопропан (у которого нет кислорода, способного образовывать такие связи) в одинаковой степени тормозят активность холинэстеразы. Бергман (Bergmann, 1958; Bergmann et al., 1958) считает, что при взаимодействии с ферментом ацетилхолина водородная связь образуется; именно в этом он видит причину различной способности

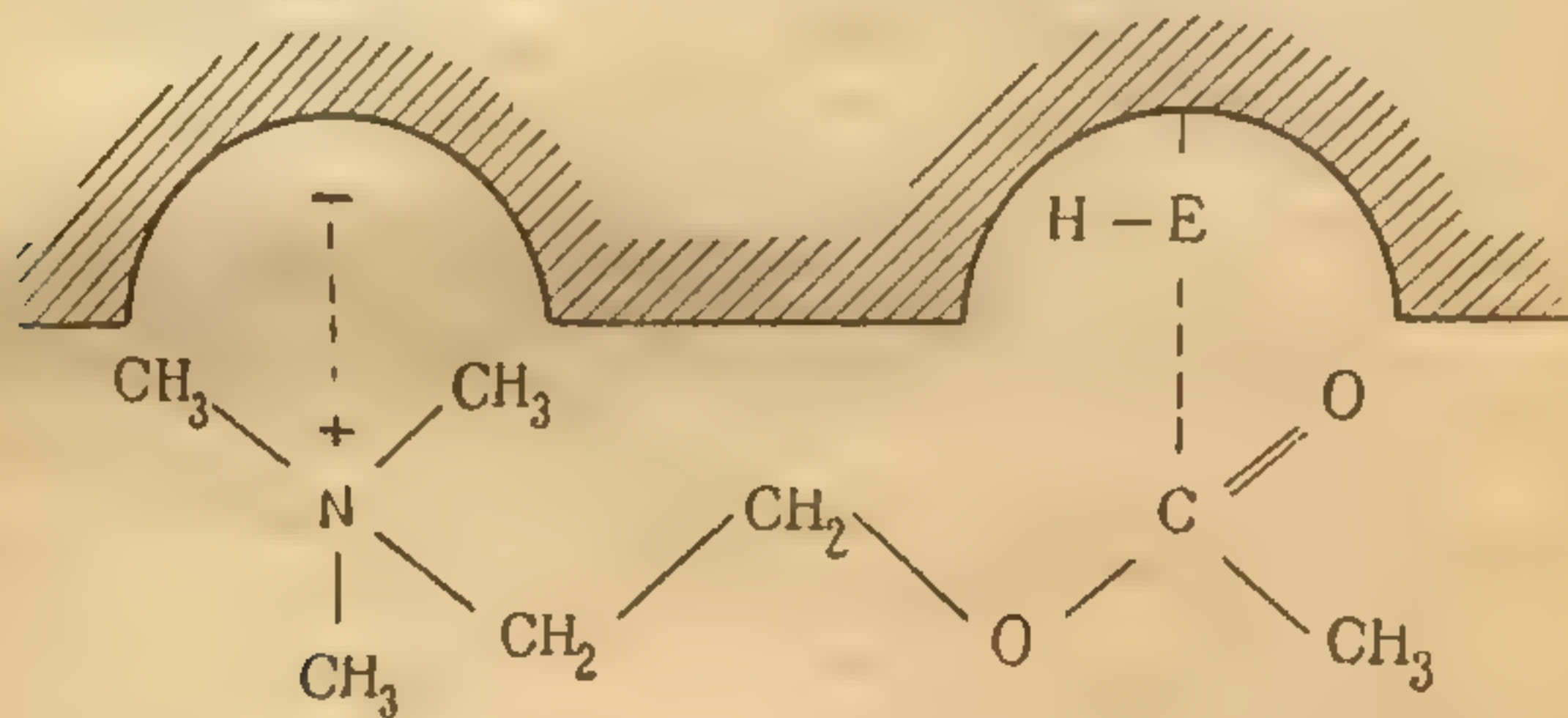


рис. 7. Схема строения активной поверхности холинэстеразы (комплекс холинэстеразы с ацетилхолином).

холинэстеразы гидролизовать ацетилхолин и ацетилтиохолин, у которого эфирный кислород заменен на серу, благодаря чему он лишен способности образовывать водородную связь с активной поверхностью фермента. По мнению Хейльброн (Heilbronn, 1959), истинная холинэстераза образует водородную связь с субстратом, а ложная не образует.

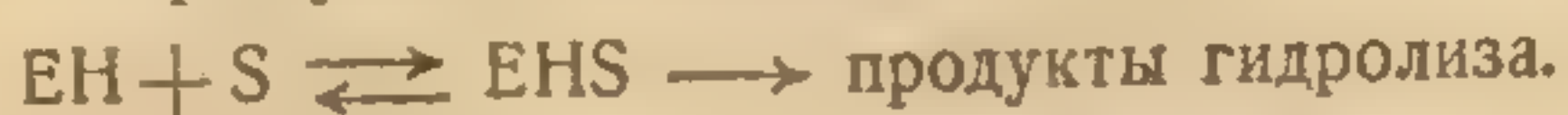
Расстояние между обоими центрами должно быть таким же, как между атомом азота и эфирной связью в молекуле ацетилхолина. Но измерить это расстояние, используя структуру ацетилхолина, трудно, так как углеродная цепочка этого соединения не имеет жесткой структуры и, в зависимости от условий, может изгибаться в различных направлениях. Для преодоления этой трудности Фрис и Балдридж (Friess, Baldrige, 1956) синтезировали ряд четвертичных аминоэфиров с жестким строением. Некоторые из них оказались даже лучшими субстратами холинэстеразы, чем ацетилхолин, например эфиры триметиламиноциклопентанола.

На основании сопоставления гидролизуемости цис- и транс-изомеров этих соединений авторы пришли к заключению, что расстояние между анионным и эстеразным центрами составляет около 2,5 Å.



## ГИДРОЛИЗ АЦЕТИЛХОЛИНА

Образование фермент-субстратного комплекса является первым этапом в системе реакций, обеспечивающих гидролиз ацетилхолина холинэстеразой. Затем этот комплекс распадается с образованием продуктов гидролиза:



В этой схеме EH обозначает фермент, S — субстрат, а EHS — активный, способный к распаду комплекс. Известно, что истинная холинэстераза тормозится избытком субстрата. Схематически можно представить себе это таким образом: в условиях избытка ацетилхолина комплекс EHS вместо того, чтобы распасться, присоединяет к себе еще одну молекулу субстрата и превращается из активного в неактивный:



Существуют данные (Gregoire et al., 1956), согласно которым комплекс  $EHS_2$  не полностью лишен активности, а лишь в 10 раз менее активен, чем нормальный комплекс EHS.

Вопрос о механизме тормозящего действия избытка ацетилхолина неоднократно был предметом обсуждения в литературе. По мнению Бергмана (Bergmann, 1955), который считает, что

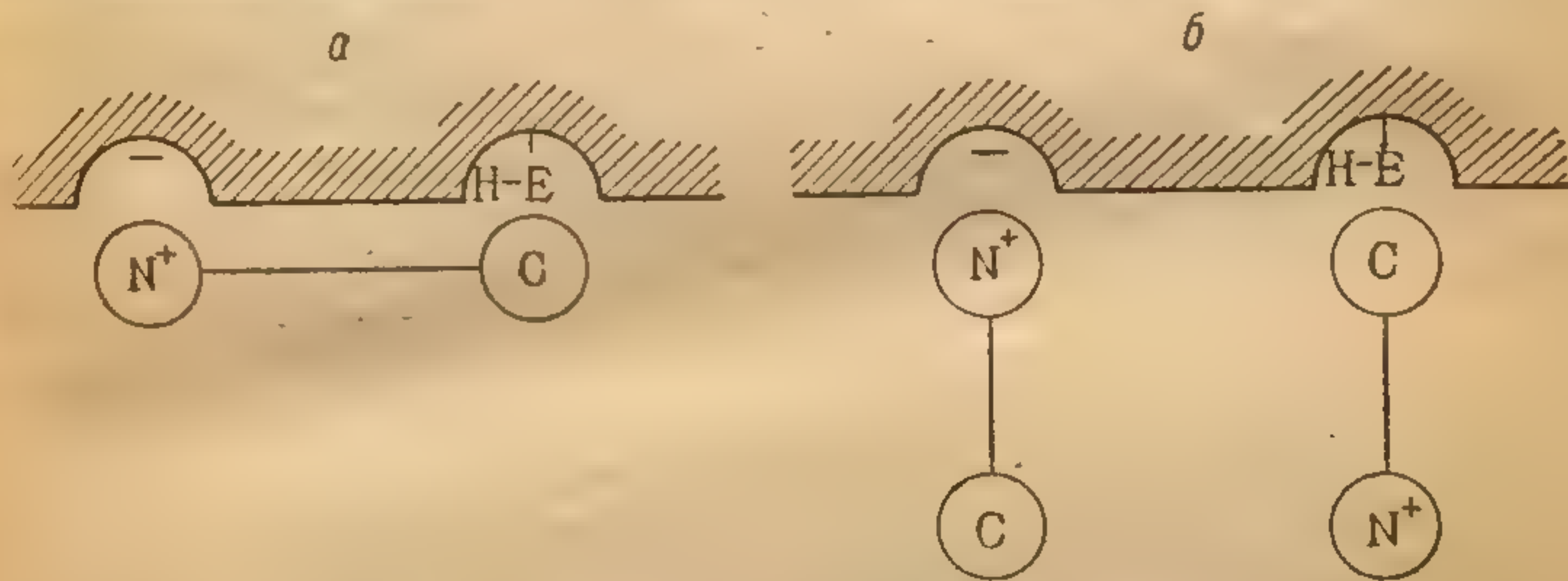


Рис. 8. Схема комплекса холинэстеразы с субстратом.

а — обычный комплекс фермент—субстрат; б — комплекс фермент—субстрат при избытке субстрата.

истинная холинэстераза в отличие от ложной содержит не один, а два анионных центра, в случае наличия избытка субстрата с каждым анионным центром может соединиться одна молекула ацетилхолина, благодаря чему подход субстрата к эстеразному центру будет затруднен. Другие исследователи (Davies, Green, 1959) полагают, что причиной образования неактивного комплекса является своеобразная ориентация субстрата на поверхности фермента, отличающаяся от той, которая имеет место, когда избытка субстрата нет (рис. 8). Крупка и Лейдлер (Крупка,



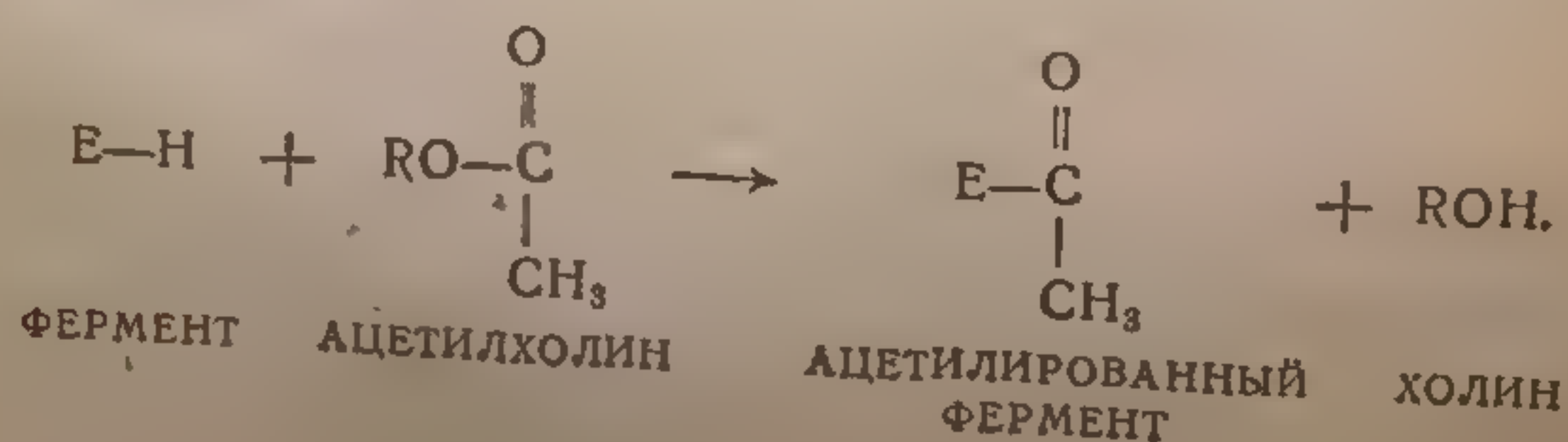
Laidler, 19616) на основании тщательно проведенных кинетических исследований убедительно показали, что механизм инактивации холинэстеразы избытком субстрата состоит в присоединении второй молекулы ацетилхолина не к свободному, а к ацилированному ферменту, в результате чего блокируется процесс деацетилирования (см. ниже).

Определение некоторых свойств комплекса фермент — субстрат позволяет оценить очень важную величину, характеризующую каталитическую активность, а именно степень сродства фермента к субстрату. Эта величина определяется так называемой константой сродства ( $K_c$ ), которая численно равна единице, деленной на константу диссоциации ( $K_d$ ) комплекса фермент — субстрат:

$$K_c = 1/K_d.$$

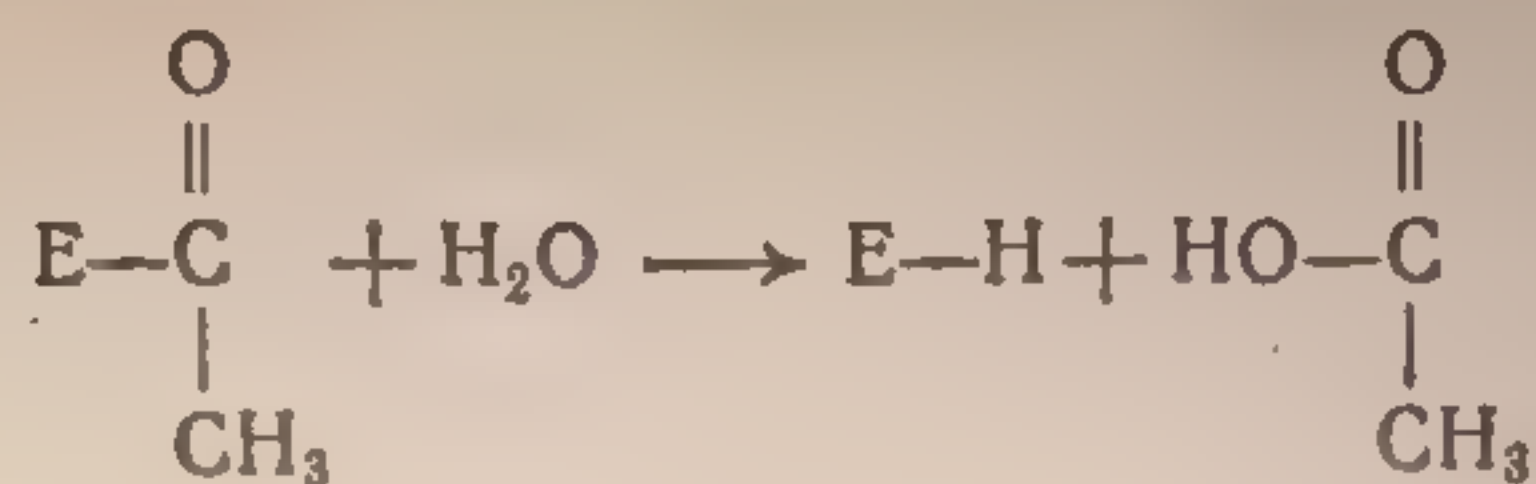
Иными словами, чем меньше величина  $K_d$ , тем выше сродство фермента к субстрату. Грегуар и др. (Gregoire et al., 1955a, б) определили константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов истинной и ложной холинэстеразы с некоторыми субстратами в различных условиях. В экспериментальных условиях авторов ( $25^\circ$ ,  $pH = 7,5$ )  $K_d$  для комплекса холинэстеразы сыворотки с ацетилхолином была равна  $1,47 \cdot 10^{-3}$ , а для комплекса того же фермента с бензоилхолином —  $4,5 \cdot 10^{-5}$ . Комплекс холинэстеразы эритроцитов — ацетилхолин характеризовался  $K_d$ , равной  $6 \cdot 10^{-5}$ . Из этих данных вытекает, что истинная холинэстераза обладает большим сродством к ацетилхолину, чем ложная. В то же время ложная холинэстераза обладает к бензоилхолину большим сродством, чем к ацетилхолину. В цитированной работе была выявлена одна важная особенность. Оказалось, что при увеличении концентрации солей, в частности хлористого калия, в среде величина  $K_d$  для комплекса холинэстеразы — ацетилхолин увеличивалась как для ложной, так и для истинной холинэстеразы. Это значит, что хлористый калий уменьшает сродство холинэстеразы к субстрату.

Распад комплекса фермент — субстрат с образованием продуктов реакции происходит не сразу, а постепенно, в два этапа. На первом этапе ацетильный остаток субстрата присоединяется к ферменту, замещая содержащийся в нем протон, а остаток холина, с которым этот протон соединяется, отщепляется в виде свободного холина:





Образовавшийся ацетилированный фермент нестоек и быстро подвергается спонтанному гидролизу, в результате чего образуется уксусная кислота и исходный фермент:



Очень важно подчеркнуть, что ацетилированный (или в более общем виде — ацилированный) фермент является обязательным промежуточным продуктом, образующимся при гидролизе ацетилхолина (и других сложных эфиров).

### ЭСТЕРАЗНЫЙ ЦЕНТР

До сих пор наши рассуждения ограничивались общими представлениями об активной поверхности холинэстеразы и рассмотрением функциональной роли отдельных участков молекулы ацетилхолина в осуществлении процесса ферментативного гидролиза. Кратко эти рассуждения сводятся к следующему. Анионный центр фермента выполняет ориентирующую функцию: он притягивает к себе катионную головку ацетилхолина и тем самым способствует ориентации молекулы субстрата на активной поверхности фермента. Собственно гидролизующую функцию выполняет эстеразный центр путем взаимодействия основной (нуклеофильной) группы этого центра с имеющим некоторый избыток положительного заряда (электрофильным) атомом углерода карбонильной группы субстрата.

Анионный центр свойствен только холинэстеразе, что же касается эстеразного центра, то он имеется у всех эстераз и лишь незначительно отличается по своим свойствам у разных ферментов. Это обстоятельство позволяет при изучении химического строения эстеразного центра пользоваться данными, полученными не только на холинэстеразе, но и на многих других эстеразах, а также на некоторых протеазах (трипсин, химотрипсин, тромбин), которые, как оказалось, тоже обладают эстеразным действием.

На этих данных следует остановиться несколько подробнее. Эстеразное действие трипсина и химотрипсина было открыто Нейратом и его сотрудниками (Schwert, Neurath et al., 1948; Kaufman, Neurath, Schwert, 1949). Оба фермента выражено катализировали гидролиз эфиров аминокислот — например, этилового эфира бензоилтирозина и этилового эфира ацетилтиро-



зина. Гидролиз этих эфиров под действием химотрипсина протекал даже быстрее, чем расщепление специфического пептидного субстрата химотрипсина — глицил-L-тирозиламида. Авторы высказали предположение, что эстеразное и амидазное действие этих ферментов осуществляется за счет одних и тех же активных центров. В дальнейшем это было подтверждено при изучении влияния изотопов на эстеразную и протеазную активность трипсина. Оказалось, что при добавлении к раствору трипсина тяжелой воды ( $D_2O$ ) обе активности подавлялись в равной мере (Mason, Ghiron, 1961). При более углубленном исследовании этого вопроса путем изучения кинетики инактивации трипсина под действием рентгеновского и ультрафиолетового облучения было установлено, что собственно гидролиз сложноэфирной и пептидной связи обеспечивается одним и тем же центром, тогда как группировки, участвующие в связывании фермента с субстратами обоих типов, могут быть различными (Augenstine, 1959).

Постепенно стали накапливаться данные, свидетельствующие о том, что способность расщеплять эфиры аминокислот свойственна многим протеолитическим ферментам. Было показано наличие эстеразной активности у папаина (McDonald, Balls, 1957), тромбина (Miller, van Vunakis, 1956), протромбина (Seegers, Landaburu, 1957) и пептидазы (Shippley, Binkley, 1958). Гидролитическая активность пептидазы почек по отношению к сложным эфирам была на 1 порядок ниже, чем по отношению к амидам. В последнее время было показано, что эстеразной активностью обладает и дегидрогеназа трифосфоглицеральдегида (Park et al., 1961). Третье переэкристилизованный фермент, обработанный активированным углем для удаления связанного с белком дифосфопиридинуклеотида, выраженно катализировал гидролиз п-нитрофенилацетата. В сопоставимых условиях химотрипсин гидролизует этот субстрат в 5 раз медленнее. Эстеразная активность дегидрогеназы трифосфоглицеральдегида подавлялась фосфорорганическими ингибиторами эстераз и сульфгидрильными реагентами. Выраженными эстеразными свойствами обладает также кристаллический альбумин из сыворотки крови различных животных (Casida, Augenstinson, 1959; Tove, 1962). Он способен гидролизовать многие эфиры  $\beta$ -нафтола и жирных кислот с разной длиной цепи. В отличие от других эстераз его ферментативная активность оказалась устойчивой к действию фосфорорганических ингибиторов.

Многие из перечисленных выше ферментов были использованы для изучения структуры эстеразного центра. Чаще всего это было обусловлено тем, что некоторые из них, например трипсин и химотрипсин, в отличие от холинэстеразы и других



эстераз могут быть получены в кристаллическом виде, т. е. в форме индивидуальных химических веществ, практически лишенных каких бы то ни было примесей.

### УЧАСТИЕ ИМИДАЗОЛА В ЭСТЕРАЗНОМ ЦЕНТРЕ

Теоретические соображения о химической природе эстеразного центра могут быть высказаны, исходя из данных о влиянии pH на активность эстераз. Сопоставление результатов отдельных экспериментальных исследований, выполненных на эстеразах разного происхождения с использованием различных субстратов, показывает, что кривые зависимости активности фермента от pH чрезвычайно сходны в кислой части и значительно менее однородны в щелочной. При увеличении pH от 5,0 до 7,0—7,5 активность фермента во всех случаях резко возрастает, доходя до максимума, который, как правило, лежит между 7,5—8,5. Дальнейшее повышение pH может иметь различные последствия: в одних случаях скорость гидролиза субстрата более или менее круто снижается, в других она не меняется и кривая принимает направление, параллельное оси абсцисс (рис. 9).

Уже отмечалось, что Вильсон и Бергманн (Wilson, Bergmann, 1950a) предложили рассматривать две ветви кривых зависимости активности фермента от pH

как кривые титрования двух активных групп. Тогда восходящая ветвь должна соответствовать группе с  $pK = 5,8—7,0$ , а вторая (нисходящая) ветвь — группе с  $pK = 8,5—9,5$ . Совершенно очевидно, что если восходящие ветви кривых, полученных в разных условиях, хорошо совпадают друг с другом, то первая группа (с  $pK = 5,8—7,0$ ) является общей для всех эстераз и не зависит от примененного субстрата. Вторая группа менее характерна и, по-видимому, не определяет основных свойств фермента.

В белках очень мало групп, имеющих  $pK = 5,8—7,0$ . К их числу относится имидазольное ядро, входящее в состав аминокислоты гистидина. Свободный имидазол имеет  $pK = 6,9$  (Kirby,

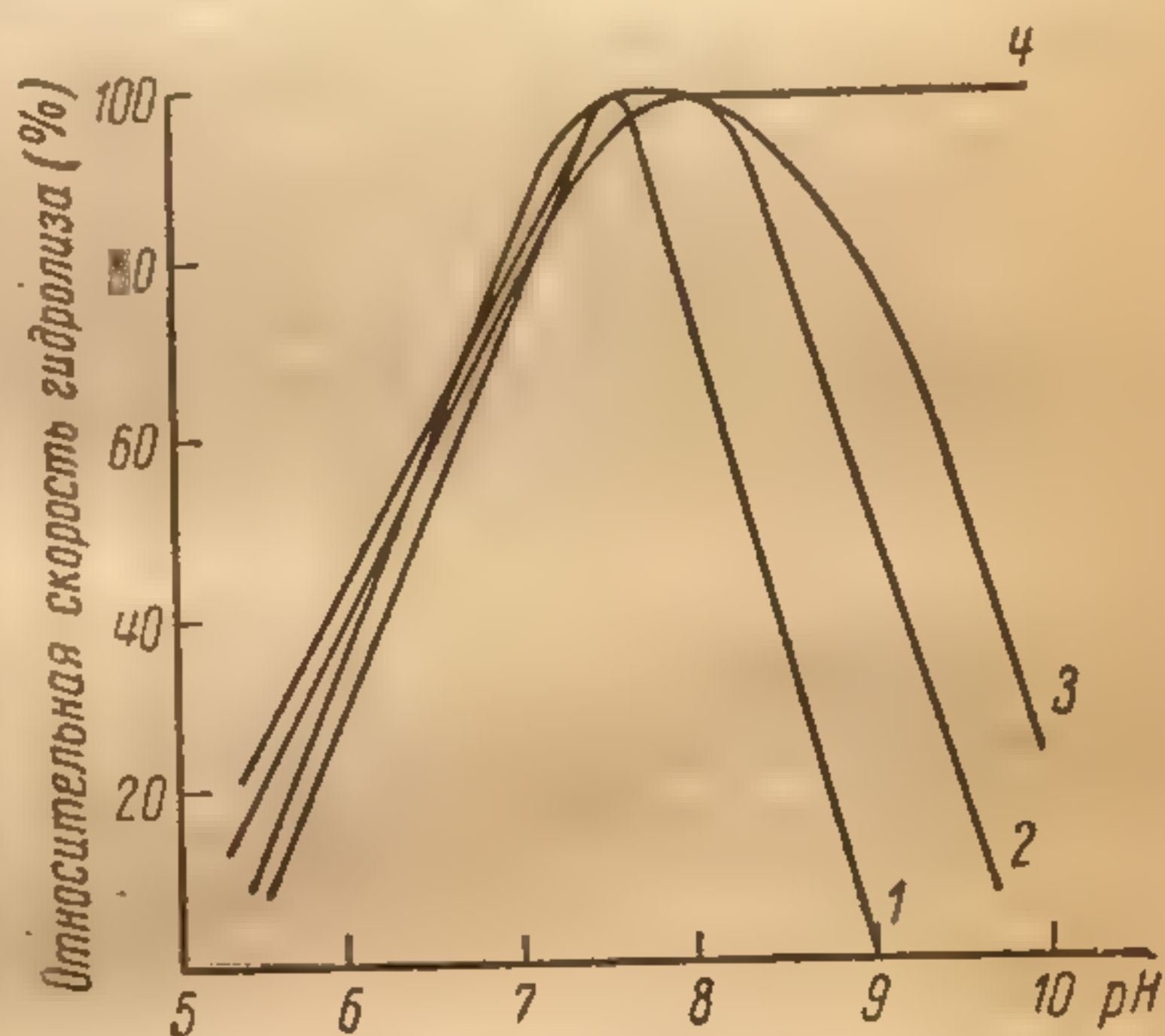
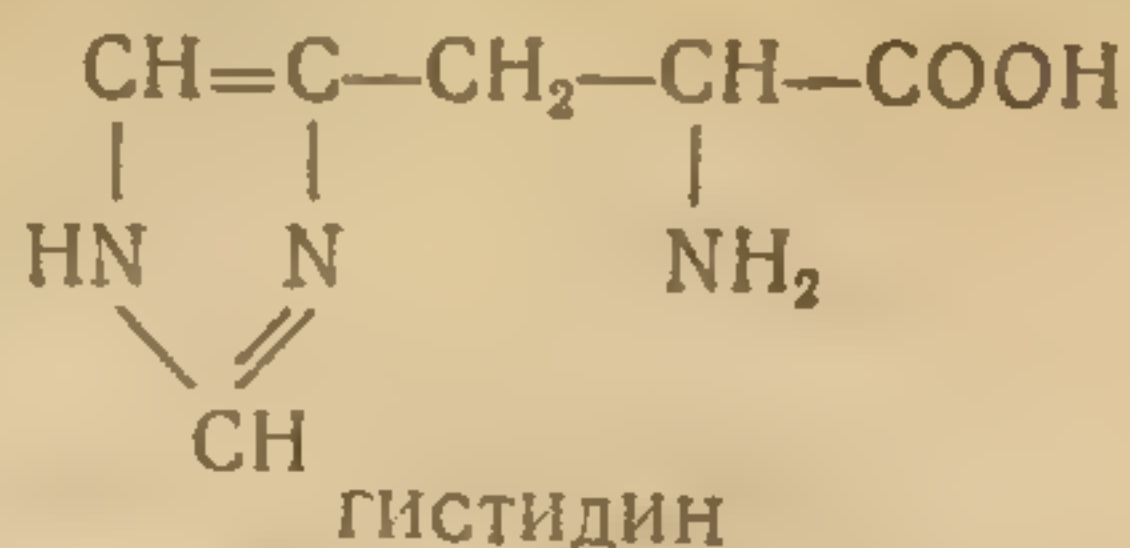


Рис. 9. Зависимость активности холинэстеразы по отношению к различным субстратам от pH. (Составлено по данным Bergmann, 1958.)

1 — пропилфторацетат; 2 — пропилхлорацетат;  
3 — ацетилхолин; 4 — ацетилтихолин.

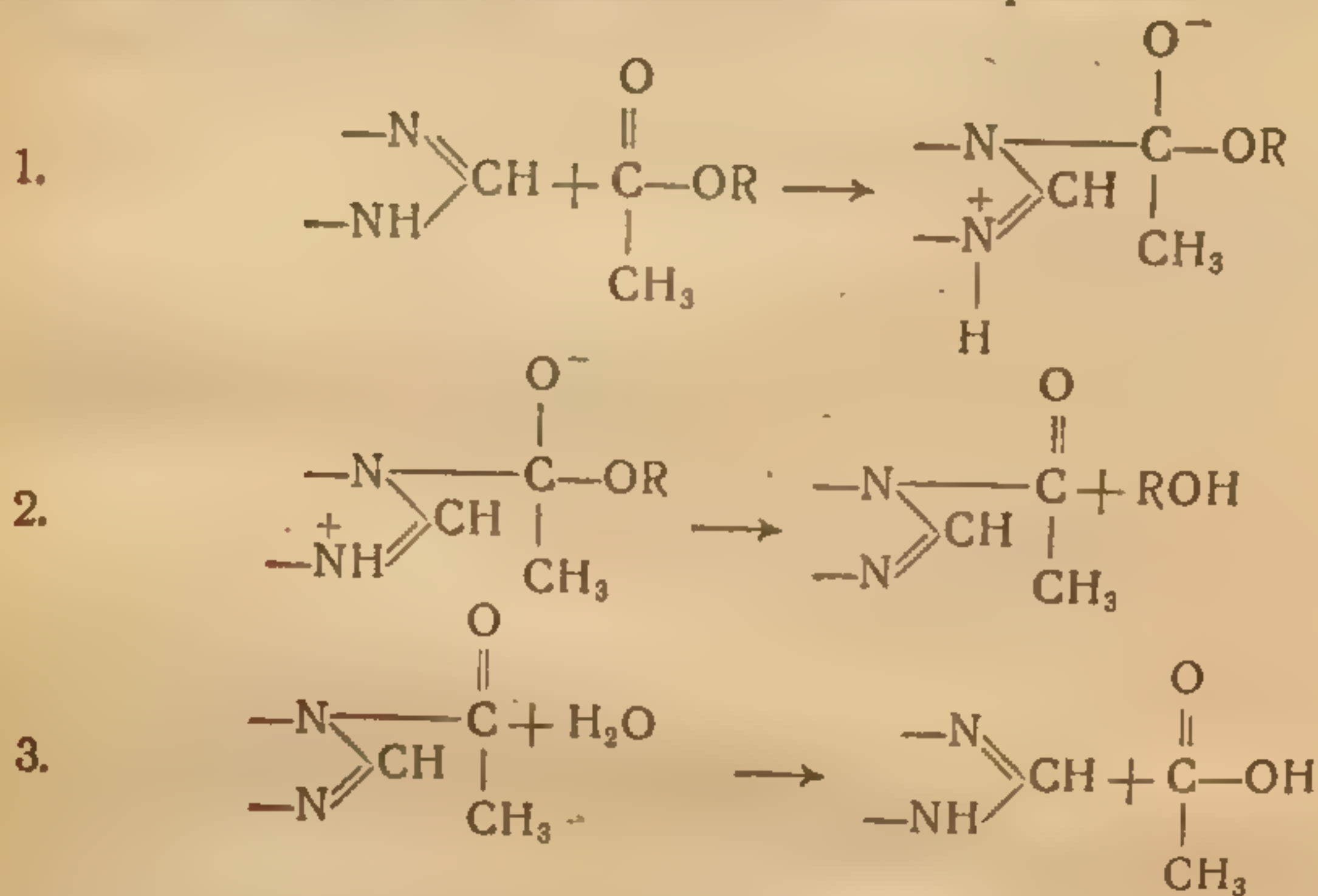


Neuberger, 1938), а рК гистидина и его пептидов колеблется между 5,6 и 7 (Cohn, Edsall, 1943).



Поэтому не удивительно, что еще в 1950 г. была высказана мысль о возможной роли имидазола в каталитическом действии эстеразы (Wilson, Bergmann, 1950a). В 1953 г. Стадтман и Уайт (Stadtman, White, 1953) показали, что имидазол способен образовывать нестойкие ацилпроизводные, подвергающиеся спонтанному гидролизу.

Участие имидазола в эстеразном катализе можно представить себе в виде трех последовательных реакций:



На первом этапе происходит нуклеофильная атака азота имидазола на углерод карбонильной группы сложного эфира, в результате чего образуется промежуточное комплексное соединение, которое на втором этапе распадается с образованием ацилированного имидазола и свободного спирта. На третьем этапе ацилированный имидазол спонтанно гидролизуется под действием воды, распадаясь на исходный имидазол и свободную кислоту. Легко убедиться, что при суммировании этих трех реакций получится уравнение гидролиза сложного эфира.

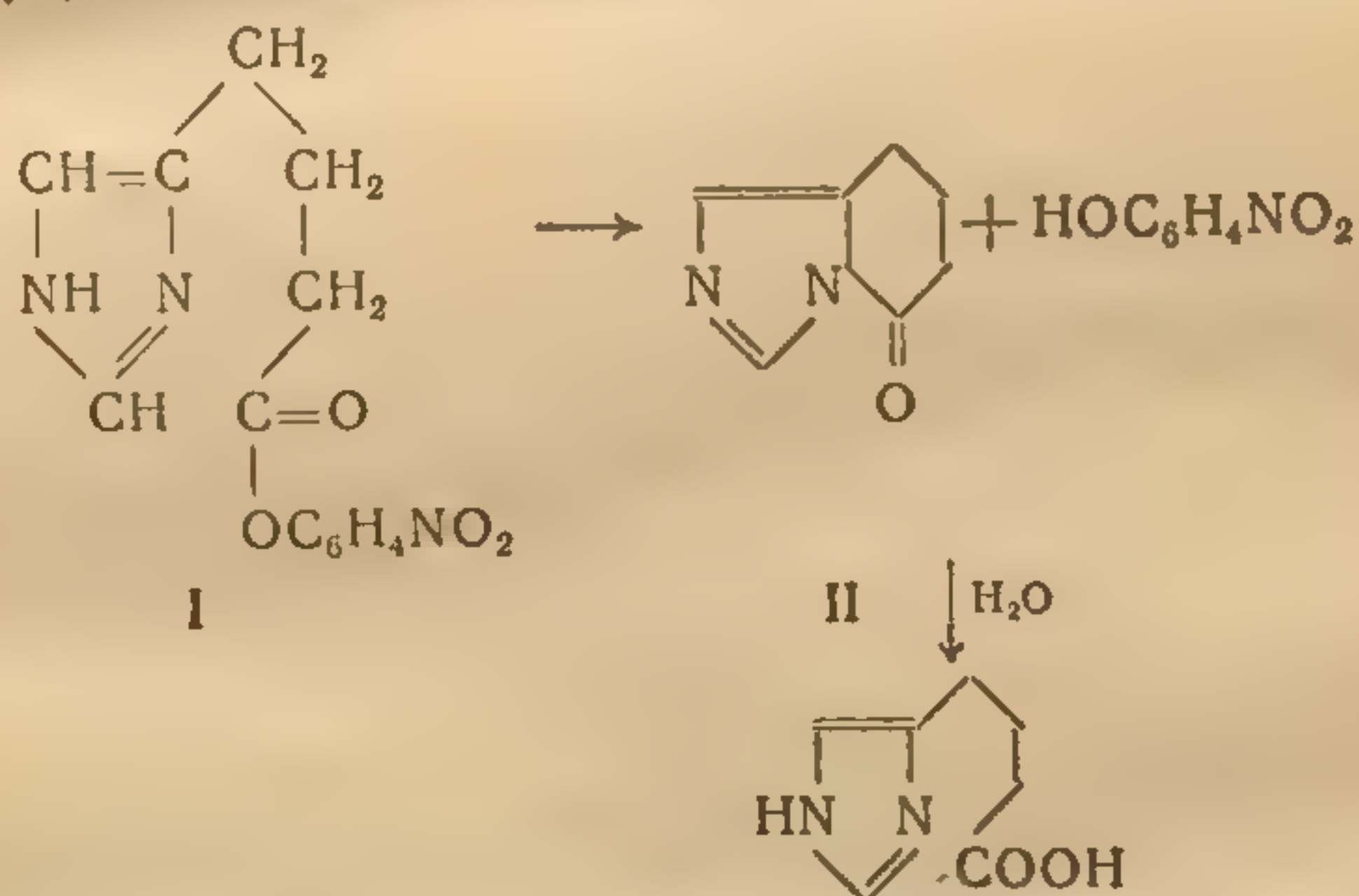
Существует ряд экспериментальных данных, подтверждающих участие имидазола в ферментативном катализе гидролиза сложных эфиров. Многими авторами (Bruice, Schmir, 1956; Bender, Turnquest, 1957a, 1957b; Brouwer et al., 1957; Bruice, 1959; Pandit, Bruice, 1960) установлено, что имидазол и некоторые его производные (гистидин, гистамин и др.) являются моделями



эстеразы, т. е. сами по себе катализируют гидролиз различных сложных эфиров. При этом оказалось, что, заметно ускоряя разложение ацетилтиохолина, имидазол совершенно не действует на его тионовый изомер (Bergmann, 1958), который не гидролизуется и под действием эстераз.

Маунтер и сотр. (Mounter et al., 1957) показали, что вещества, связывающие иминогруппы имидазола: диазобензолсульфоновая кислота, динитрофторбензол, этил-бис-( $\beta$ -хлорэтил)-амин, в относительно низких концентрациях (порядка  $10^{-4}$ — $10^{-6}$  M), тормозят активность всех изученных эстераз. По данным Вейля и др. (Weil et al., 1953), а также Яндорфа и др. (Jandorf et al., 1955a, б), разрушение одного из двух гистидиновых остатков химотрипсина с помощью избирательного фотоокисления нарушает ферментативную активность и способность фермента реагировать с фосфорорганическими ингибиторами. Обработка химотрипсина 2,4-динитрофторбензолом также приводила к инактивации, причем степень утраты активности была пропорциональна объему реакции между динитрофторбензолом и одним из двух гистидиновых остатков (Hartley, 1956; Massey, Hartley, 1956). Необходимо указать, что результаты этих исследований следует оценивать с осторожностью, так как примененные воздействия не являются строго специфичными и при этом не могут быть исключены побочные и вторичные эффекты.

Значительный интерес представляют попытки Бруса и сотр. создать на основе имидазола внутримолекулярные модели фермент-субстратного комплекса. Первоначально для этой цели был использован 2-(имидазолил-4')-фенилацетат (Schmir, Bruice, 1958), но в дальнейшем оказалось (Bruice, Sturtevant, 1958), что значительно более удачной моделью может служить п-нитрофенил- $\gamma$ -(4-имидазолил)-бутират (I).

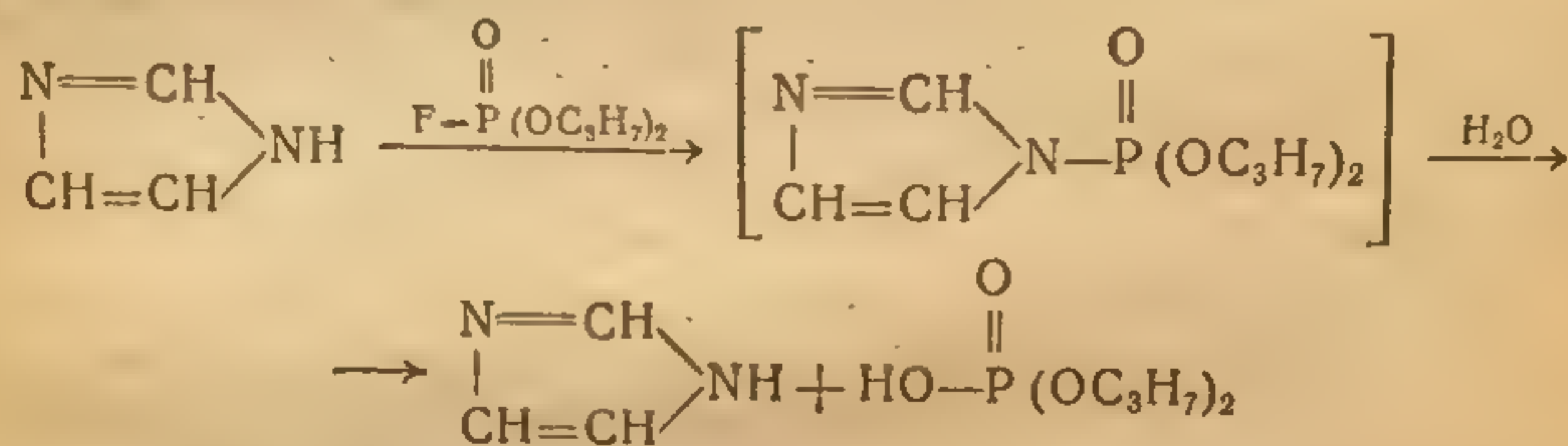


Лактамизация I протекает по приведенной схеме. При этом образуется лактам (II) и отщепляется свободный п-нитрофенол. Соединение II под действием воды легко превращается в  $\gamma$ -ими-



дазолилмасляную кислоту. Было установлено, что процесс лакта-  
мизации протекает по уравнению реакции первого порядка и  
что при 25° и pH = 7,5 в 50%-ном водном спирте период полу-  
распада I составляет 0,2 сек. Из данных зависимости скорости  
реакции от pH была вычислена константа ионизации имида-  
золильного остатка в I. Она оказалась такой же, как в химо-  
трипсине (pK = 6,3). Экстраполированная константа скорости  
отщепления п-нитрофенола от I оказалась равной 3,3 сек<sup>-1</sup>, т. е.  
точно совпадала с константой скорости отщепления п-нитрофе-  
нола от комплекса химотрипсин-п-нитрофенилацетат.

О роли имидазола в эстеразном катализе свидетельствует и  
то обстоятельство, что имидазол обладает способностью реаги-  
ровать с фосфорорганическими ингибиторами эстераз. Вагнер-  
Яурегг и Хакли (Wagner-Jauregg, Hackley, 1953) предложили  
следующую схему реакции имидазола с диизопропилфторфос-  
фатом:



По этой схеме промежуточный продукт — фосфорилирован-  
ный имидазол — является нестойким соединением и легко под-  
вергается гидролизу с отщеплением свободного имидазола и об-  
разованием диизопропоксифосфорной кислоты.

В качестве одного из доказательств участия имидазола в  
эстеразном катализе приводились также данные разных авторов  
об изменении оптической плотности при 245 мμ в ходе фермен-  
тативного гидролиза (Gutfreund, Sturtevant, 1956; Dixon et al.,  
1956; Dixon, Neurath, 1957). Интерес к этой области спектра  
возник потому, что именно при этой длине волны отмечается  
максимум поглощения N-ацетилимидазола. Было установлено,  
что при отщеплении ацетильного остатка от ацетилхимотрипси-  
на поглощение при 245 мμ сначала быстро повышается, а потом  
постепенно снижается. Скорость этого снижения соответство-  
вала скорости деацетилирования фермента. На этом основании  
был сделан вывод, что имидазол принимает непосредственное  
участие в реакции деацетилирования.

Исследованиями последнего времени (Wootton, Hess, 1961)  
этот вывод поставлен под сомнение. Было показано, что умень-  
шение оптической плотности при 245 мμ может наблюдаться  
при сохранении до 90% ацетилированного химотрипсина. По-  
видимому, этот процесс связан не с деацетилированием, а с дез-  
агрегацией молекулы фермента.



Таковы важнейшие экспериментальные данные, касающиеся роли имидазола в ферментативном гидролизе сложных эфиров. Необходимо подчеркнуть, что все доказательства в пользу участия имидазола являются косвенными и многие из них не безупречны в методическом отношении.

С другой стороны, существуют прямые данные, говорящие против участия имидазола в этом процессе. Так, из ацетилтрипсिनогена путем пептического гидролиза и последующей хроматографии на диэтиламиноэтилцеллюлозе удалось выделить фрагмент (полипептид) с молекулярным весом 6650, который обладал ясно выраженными каталитическими свойствами в отношении гидролиза п-нитрофенилацетата и других сложных эфиров и вместе с тем практически не содержал гистидина (Viswanatha, Liener, 1960). На основании этих данных авторы пришли к выводу о том, что имидазол вообще не входит в состав активного центра химотрипсина.

#### УЧАСТИЕ СЕРИНА В ЭСТЕРАЗНОМ ЦЕНТРЕ

Другой путь изучения химического строения активной поверхности эстераз состоит в исследовании продуктов гидролиза ферментного белка, угнетенного фосфорорганическими ингибиторами, содержащими радиоактивную метку. Преимущества этого пути заключаются в том, что специфический фосфорорганический ингибитор, например диизопропилфторфосфат, избирательно взаимодействует с активной группой фермента, прочно присоединяется к ней и вместе с тем не оказывает сколько-нибудь заметного влияния на структуру остальной части белковой молекулы. При последующем осторожном гидролизе такого белка из него удается выделить пептиды, содержащие радиоактивную метку. Эти пептиды и можно рассматривать как часть активной поверхности фермента. Этот метод был применен многими исследователями для изучения различных ферментов, причем были использованы различные фосфорорганические ингибиторы, меченные  $P^{32}$  или  $C^{14}$ . Во многих случаях выделенные пептиды были подробно анализированы и последовательность аминокислот в них была полностью расшифрована. Таким путем были изучены трипсин (Dixon et al., 1956, 1958a, 1958b; Oosterbaan et al., 1956; Schaffer et al., 1958; Sorm et al., 1961), химотрипсин (Turba, Gundlach, 1955; Oosterbaan et al., 1958a, 1958b; Shaffer et al., 1956, 1957), печеночная эстераза (Jansz et al., 1959a, 1959b), ложная холинэстераза (Cohen et al., 1959; Jansz et al., 1959b), тромбин (Gladner, Laki, 1958), бактериальная протеаза (Sanger, Shaw, 1960), эластаза (Naughton et al., 1960), фосфоглюкомутаза (Milstein, Sanger, 1961), фосфорилаза (Fischer et al., 1959). Некоторые результаты этих исследований сведены в табл. 8.



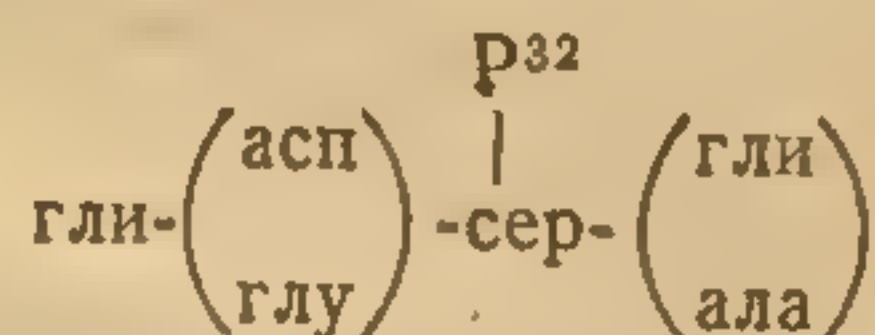
Таблица 8

Строение полипептидов, выделенных из ферментов после обработки мечеными фосфорорганическими ингибиторами

№№ пп	Фермент	Строение полипептида
1	Химотрипсин	Гли-асп-сер (P <sup>32</sup> )-гли-гли-про-лей
2	Трипсин	(NH <sub>2</sub> ) асп-сер-цис-глю-гли-гли-асп-сер (P <sup>32</sup> )-гли-про-вал-цис-сер-гли-лиз
3	Алиэстераза печени	Гли-глю-сер (P <sup>32</sup> )-ала-гли-гли-гли-(глю, сер)
4	Ложная холинэстераза	Фен-гли-глю-сер (P <sup>32</sup> )-ала-гли-(ала, ала, сер)
5	Тромбин	Асп-сер (P <sup>32</sup> )-гли
6	Бактериальная протеаза	Тре-сер (P <sup>32</sup> )-мет-ала
7	Эластаза	Асп-сер (P <sup>32</sup> )-гли
8	Фосфоглюкомутаза	Тре-ала-сер (P <sup>32</sup> )-гис-асп
9	Фосфорилаза	Лиз-глут (NH <sub>2</sub> )-изол-сер (P <sup>32</sup> )-вал-арг

Из таблицы видно, что во всех случаях, где речь шла о ферментах, обладающих эстеразной активностью и чувствительных к фосфорорганическим ингибиторам, результаты получились удивительно совпадающими, что совершенно исключает возможность артефактов.

Радиоактивная метка во всех без исключения случаях была связана с гидроксильной группой серина, и последовательность аминокислот в выделенных пептидах оказалась чрезвычайно сходной:

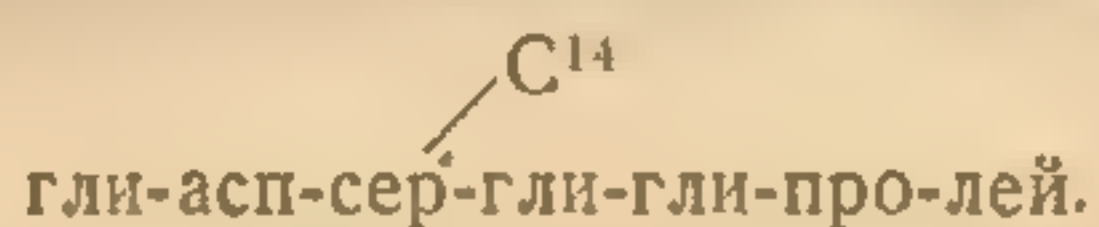


Характерной особенностью этой последовательности было то, что, с одной стороны, серин всегда был связан с двухосновной аминокислотой (в случае трипсина, химотрипсина и других протеаз — с аспарагиновой, а в случае печеночной эстеразы или ложной холинэстеразы — с глутаминовой), а с другой — аланином или глицином. Двухосновная кислота в свою очередь была соединена с глицином. В некоторых опытах, как показывает таблица, удалось расшифровать последовательность аминокислот в пептидах с относительно длинной молекулой. Так, из химотрипсина был выделен гептапептид (№ 1, табл. 8); из печеночной эстеразы — октапептид (№ 3, табл. 8), в котором удалось, правда, расшифровать последовательность только шести аминокислотных остатков; а из трипсина, обработанного диизопропилфторфосфатом, Диксону и сотрудникам удалось изолировать и полностью расшифровать полипептид, содержащий 15 остатков аминокислот (№ 2, табл. 8).

Результаты приведенных исследований были истолкованы как доказательство того, что активным центром фермента яв-



ляется участок белковой молекулы с найденной последовательностью аминокислот, а непосредственная точка приложения фосфорорганических ингибиторов, а также, вероятно, и субстрата действия фермента — это гидроксил серинового остатка. В последнее время были получены прямые доказательства того, что субстрат действительно ацилирует фермент по гидроксильной группе серина. Остербан и др. (Oosterbaan et al., 1962) использовали ацетилхимотрипсин- $C^{14}$ , полученный путем обработки химотрипсина п-нитрофенилацетатом- $C^{14}$ . Осторожный гидролиз меченого фермента с помощью пепсина, а затем котазима позволил выделить несколько пептидов, содержащих радиоактивную метку, и изучить последовательность аминокислот в них. Самым большим из них оказался гептапептид:



Сравнение этого полипептида с полипептидом № 1 из табл. 8, выделенным той же группой исследователей из химотрипсина, обработанного диизопропилфторфосфатом  $P^{32}$ , показывает их полную идентичность. Этот факт служит вполне убедительным доказательством того, что субстрат и ингибитор действительно взаимодействуют с одной и той же группой фермента и этой группой является гидроксил остатка серина.

Более детальное исследование строения других выделенных пептидов, содержащих ацетилсерин, показало, что в тех пептидах, где серин является N-концевой аминокислотой, ацетильная группа связана не с кислородом гидроксила, а с азотом аминогруппы серина, а O-ацетильными соединениями оказались только те пептиды, в которых N-концевой была другая аминокислота (Benoiton et al., 1960). Синтетически полученный O-ацетилтрипептид с N-концевым серином (I) в мягких условиях ( $pH = 7,8$ ;  $37^\circ$ ) спонтанно превращался в N-ацетилтрипептид (Benoiton, Rydon, 1960).

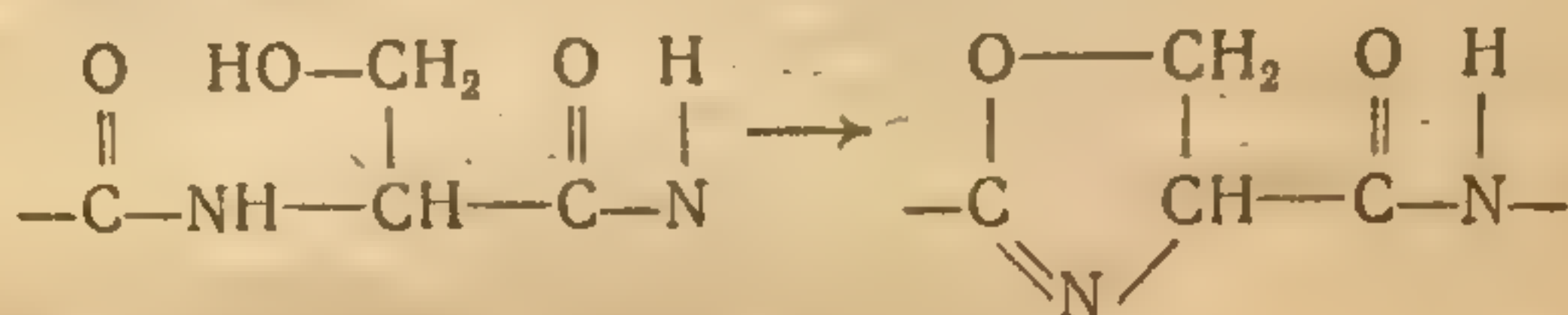


Интересно отметить, что ни в одном из полипептидов, выделенных из ферментных белков после обработки мечеными субстратами или ингибиторами, не содержалось гистидина. Даже в полипептиде, состоящем из 55 остатков аминокислот (Dixon et al., 1958a), гистидин не был обнаружен.

Для признания центральной роли серина в осуществлении эстеразного катализа необходимо было сделать некоторые допущения. Известно, что свободный серин является сравнительно инертным соединением. Он не катализирует гидролиз сложных эфиров и практически лишен способности взаимодействовать с фосфорорганическими ингибиторами эстераз. Не обладал



каталитической активностью и синтетический полипептид, полученный на основе 2-бензилгистидина и серина (Wolley et al., 1962). Следовательно, нужно было предположить, что в активном центре фермента реакционная способность серина каким-то образом повышается. Идею реактивной формы серина выдвинули Портер и др. (Porter et al., 1958). По их мысли, серин, находящийся в составе полипептидной цепочки, циклизуется с образованием  $\Delta^2$ -оксазолина, который должен обладать более высокой реакционной способностью, чем исходный серин.



Авторы исследовали реактивность трех различных оксазолинов, полученных синтетическим путем, и показали, что два из них в водном растворе при 37° могут реагировать с диизопропилфторфосфатом с образованием продуктов, которые при кислотном гидролизе дают О-фосфоэтаноламин. Райдон (Rydon, 1958) предложил чисто умозрительную схему механизма действия эстераз, основанную на реактивности серина в форме  $\Delta^2$ -оксазолина, а также на участии в реакции  $\beta$ -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты, остаток которой всегда связан с серином в активном центре эстераз. Схема Райдона не предусматривает участие имидазола в эстеразном катализе и не подкреплена никакими экспериментальными фактами. В этой связи уместно напомнить, что, хотя предположение о возможности существования оксазолинов в молекуле нативных белков было высказано Бергманом и сотр. (Bergmann, 1923) еще в 1923 году, ни одного экспериментального подтверждения этой возможности до сих пор получено не было.

Янс и др. (1962) предприняли попытку прямыми исследованиями оценить, существуют ли в химотрипсине структуры, подобные оксазолину. Для этой цели они провели реакцию химотрипсина с п-нитрофенилацетатом в присутствии воды, содержащей тяжелый изотоп кислорода, —  $\text{H}_2\text{O}^{18}$ . При этом они исходили из следующих соображений. Если в активном центре фермента первоначально присутствуют циклические структуры типа оксазолинов или внутренних эфиров, то реакция с участием гидроксильной группы серина должна сопровождаться раскрытием циклических группировок и появлением  $\text{O}^{18}$  в образовавшихся соединениях. Было установлено, что выделенный из химотрипсина после такой обработки ацетилгептапептид не содержал избытка  $\text{O}^{18}$ . Эти данные говорят против того, что оксазолиновые или другие циклические структуры подобного типа предсуществуют в химотрипсине, но окончательный вывод мо-



жет быть сделан лишь после того, как будет установлено, возможен ли обмен кислорода в молекуле пептида в условиях, которые применялись для его получения и выделения.

В последнее время сам автор «оксазолиновой» гипотезы Райдон (Hanson, Rydon, 1962) вынужден был пересмотреть свои взгляды и признать, что в ферментах, угнетаемых фосфор-органическими ингибиторами,  $\Delta^2$ -оксазолин реактивной формой серина не является.

### ОБЪЕДИНЕННАЯ СХЕМА ЭСТЕРАЗНОГО КАТАЛИЗА

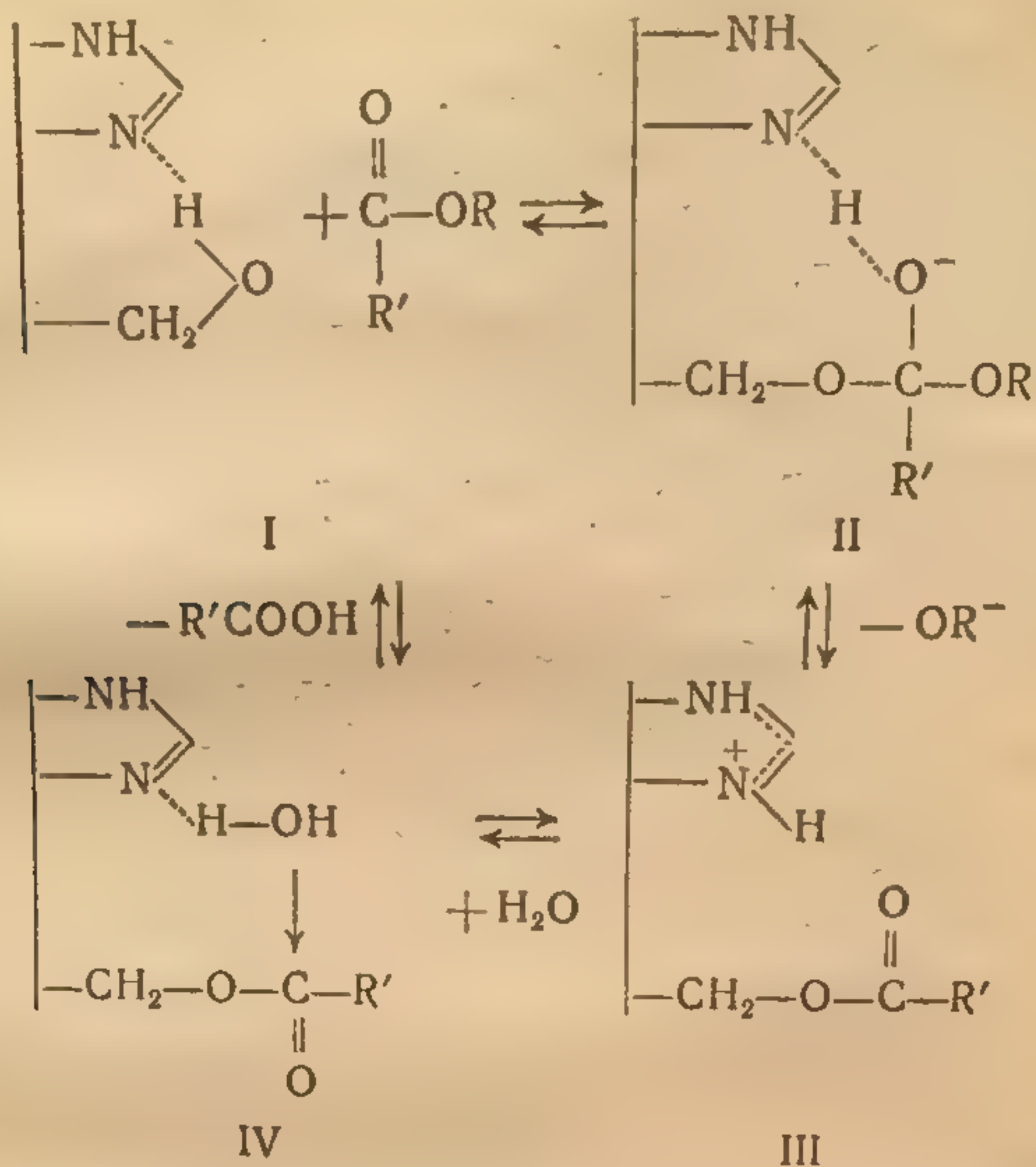
В свете этих данных могут возникнуть сомнения — участвует ли имидазол вообще в реакциях эстеразного катализа? Выше отмечалось, что имидазол не был обнаружен в полипептидах, составляющих активную поверхность эстераз, а из ацетилтрипсиногена, обработанного пепсином, удалось изолировать высокомолекулярные пептиды, обладающие ферментативной активностью и совершенно не содержащие в своем составе гистидина.

Тем не менее, мы считаем, что оснований для таких сомнений нет. Нельзя сбросить со счетов многочисленные, хотя и косвенные, доказательства роли имидазола в осуществлении ферментативного действия. Гораздо правильнее не противопоставлять друг другу отдельные обсуждаемые здесь экспериментальные факты, а попытаться объединить их в общей концепции, позволяющей с более широких позиций рассматривать проблему механизма эстеразного катализа. Такого рода попытки уже существуют в литературе. В 1957 г. Каннингем (Cunningham) сопоставил литературные данные о теплотах ионизации активного центра эстераз и имидазола и о зависимости ферментативной активности от pH и связанных с этим величинах pK основных групп активного центра со скоростями ацетилирования и фосфорилирования и предложил схему механизма энзиматического гидролиза, устраняющую многие существующие противоречия. Согласно этой схеме, в активном центре участвуют как серин, так и имидазол, причем гидроксил серина связан с имидазолом водородной связью. Эта связь активирует кислород серина и делает возможной его реакцию как с субстратами, так и с ингибиторами.

В 1959 г. Спенсер и Стартевант (Spenser, Sturtevant, 1959) несколько видоизменили и упростили схему Каннингема, сохранив ее основную суть. Новая схема также предполагает одновременное участие имидазола и серина в активном центре эстеразы. При этом гистидин не обязательно должен находиться на той же полипептидной цепочке, что и серин: их пространственная близость может быть обеспечена вторичной или третичной



структурой белковой молекулы. В активном центре (I) гидроксил серина активирован водородной связью с имидазолом.

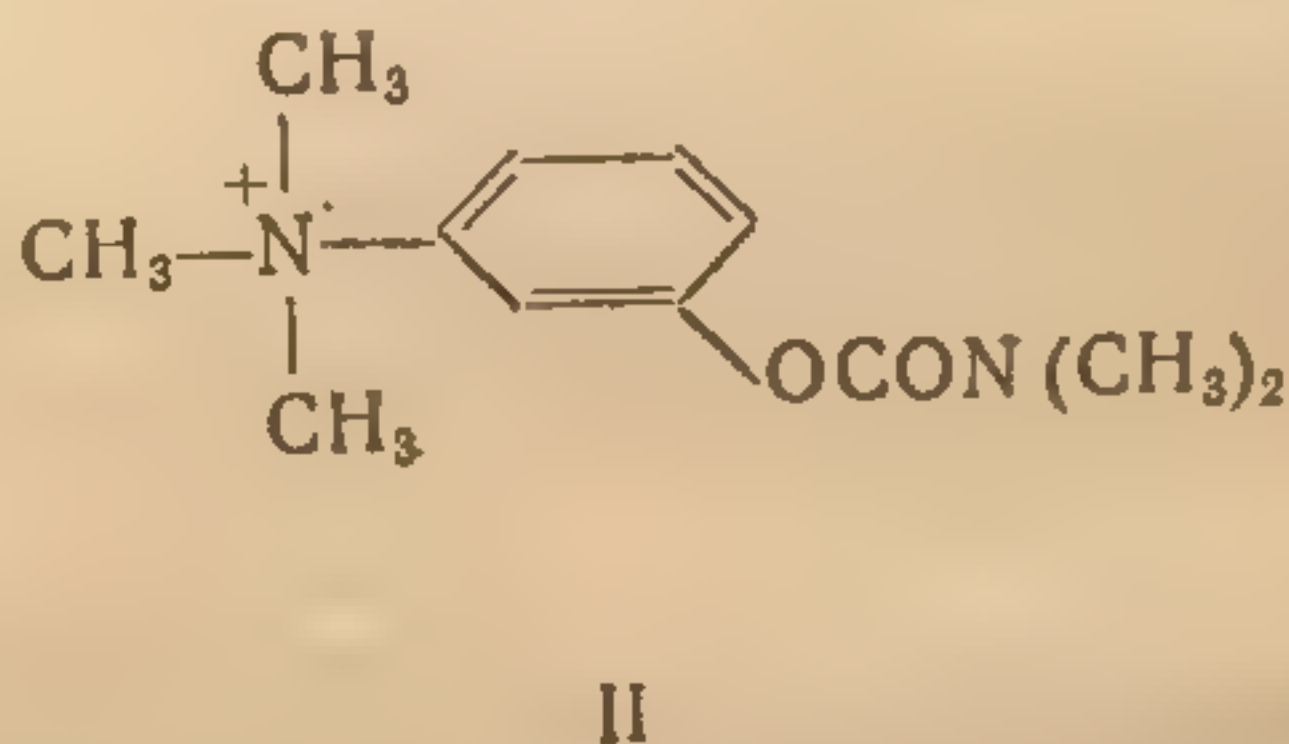
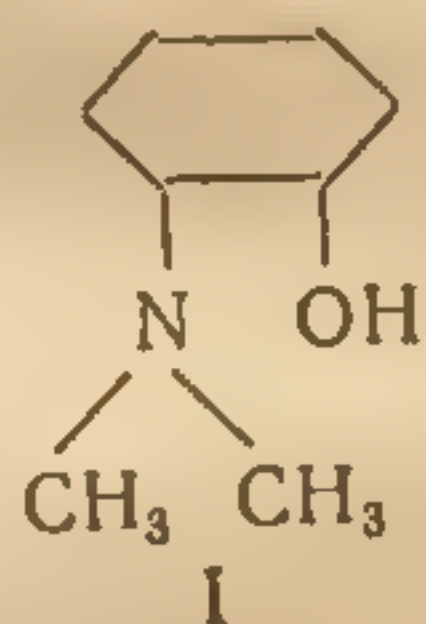


При сближении активного центра и субстрата образуется фермент-субстратный комплекс (II), который после отщепления спирта превращается в ацилированный фермент (III), причем местом ацилирования является гидроксил серина. Нестойкий III гидролизруется водой, что также протекает с помощью имидазола, который образует с водой водородную связь (IV) и тем самым активирует кислород воды. В дальнейшем после отщепления кислоты снова образуется активная форма фермента (I).

Приведенные схемы основаны главным образом на изучении свойств трипсина и химотрипсина и, как отмечалось, предполагают существование водородной связи между гидроксильной группой серина и имидазольной группой гистидина на активной поверхности фермента. В последнее время появились экспериментальные данные, противоречащие этому предположению (Fahrginey, Gold, 1963a). Авторы измеряли количество водородных ионов, которое освобождается при взаимодействии  $\alpha$ -химотрипсина с мощным ингибитором этого фермента — фенилметансульфонилфторидом. Оказалось, что при  $\text{pH} = 7,0$  освобождается 0,983 эквивалента  $\text{H}^+$  на 1 моль ингибитора. В то же время теоретический расчет показал, что при наличии водородной связи между гидроксильной группой серина и имидазольной группой гистидина в этих условиях должно было освободиться только 0,82 эквивалента  $\text{H}^+$ .



Более детальную схему эстеразного катализа, относящуюся непосредственно к холинэстеразе и дающую представление о пространственном расположении функциональных групп на активной поверхности фермента, предложили Крупка и Лейдлер (Krupka, Laidler, 1961a, б, в, г). Они провели большую серию кинетических исследований, в которых изучали действие различных ингибиторов на истинную холинэстеразу из бычьих эритроцитов. На основании своих опытов и литературных данных они пришли к выводу, что все ингибиторы гидролитических ферментов могут быть разделены на два четко отличающихся друг от друга класса. Одни блокируют процесс деацетилирования (или в более общем виде — деацилирования), другие на этот процесс не влияют. Для холинэстеразы типичным примером ингибиторов первого класса (блокирующих деацилирование) может служить цис-2-диметиламиноциклогексанол (I), а ингибиторов второго класса — прозерин (II).



Кинетически различие между ингибиторами этих двух классов состоит в том, что первые (I и близкие к нему соединения) вызывают угнетение неконкурентного или смешанного типа, тогда как вторые (II и его аналоги) всегда являются чистыми конкурентными ингибиторами. I и родственные ему соединения характеризуются общим свойством: в их молекуле катионный центр находится на расстоянии 2,5 Å от участка с высокой электронной плотностью (кислородный атом в случае I). Логично представить себе, что при взаимодействии ингибитора с ферментом именно этот участок с высокой электронной плотностью образует водородную связь с атомом водорода кислотной группы фермента. В соединении II и его аналогах (к которым относятся холин, карбохолин, эзерин и др.) катионный атом азота отделен от функциональной группы расстоянием в 5 Å. Такой функциональной группой во многих ингибиторах этого типа является карбонильная, которая при взаимодействии ингибитора с ферментом, вероятно, образует слабую электростатическую связь с основной группой эстеразного центра, представляющей собой азот имидазола.

Из приведенных рассуждений вытекает, что в активной поверхности холинэстеразы анионный центр расположен на расстоянии 2,5 Å от кислотной группы эстеразного центра и на



расстоянии 5 Å от основной группы. Такое представление вполне несовместимо с данными о строении специфического субстрата холинэстеразы — ацетилхолина.

Остается оценить относительное расположение гидроксильной группы серина, на которую переносится ацетильный остаток при образовании ацетилированного фермента из фермент-субстратного комплекса. Путем конструирования пространственных моделей Крупка и Лейдлер показали, что сериновый гидроксил

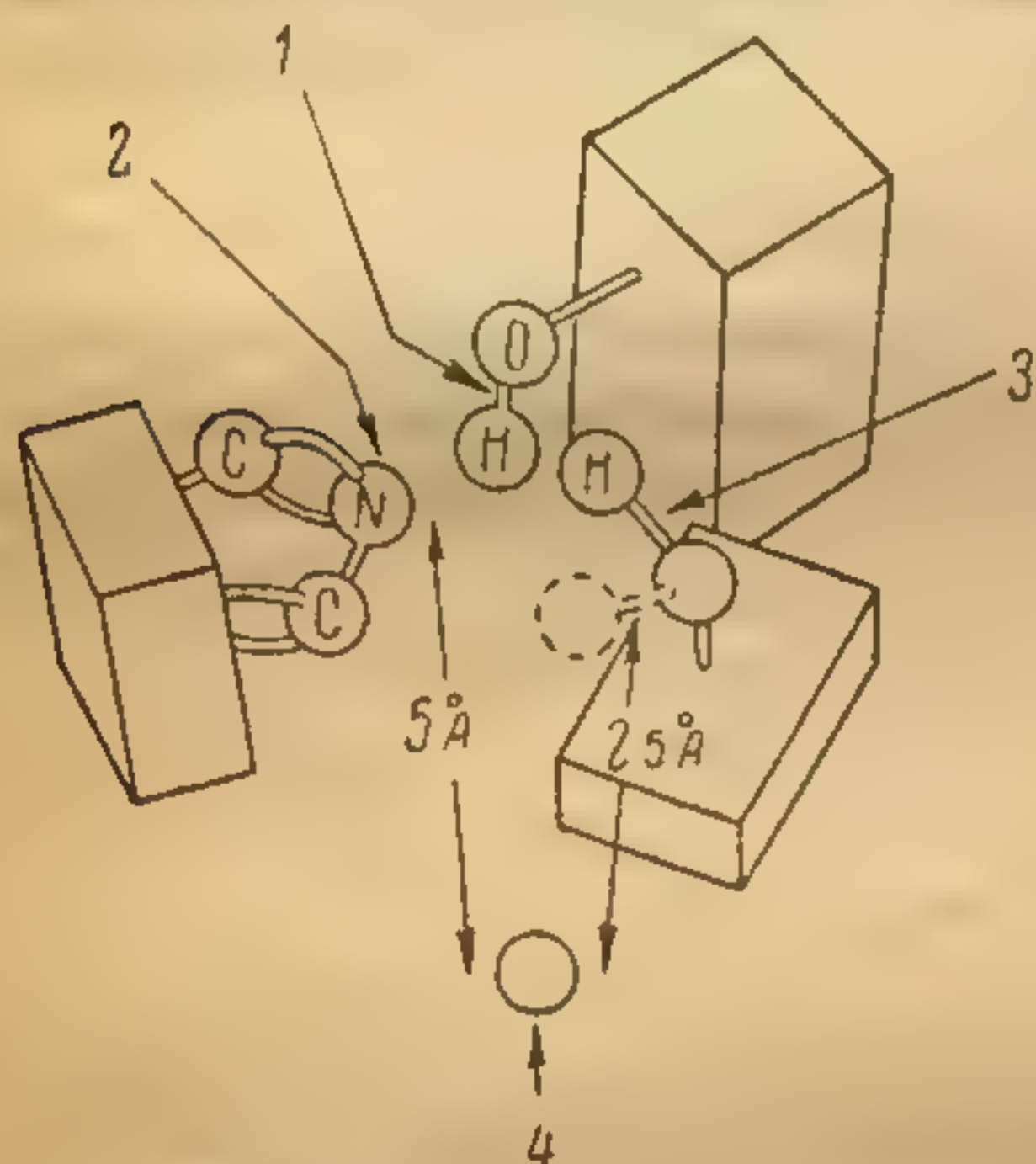


Рис. 10. Пространственная схема строения активной поверхности холинэстеразы (Krupka, Laidler, 1961).

1 — гидроксил-серина; 2 — основная группа (азот имидазола); 3 — кислотная группа; 4 — анионный центр.

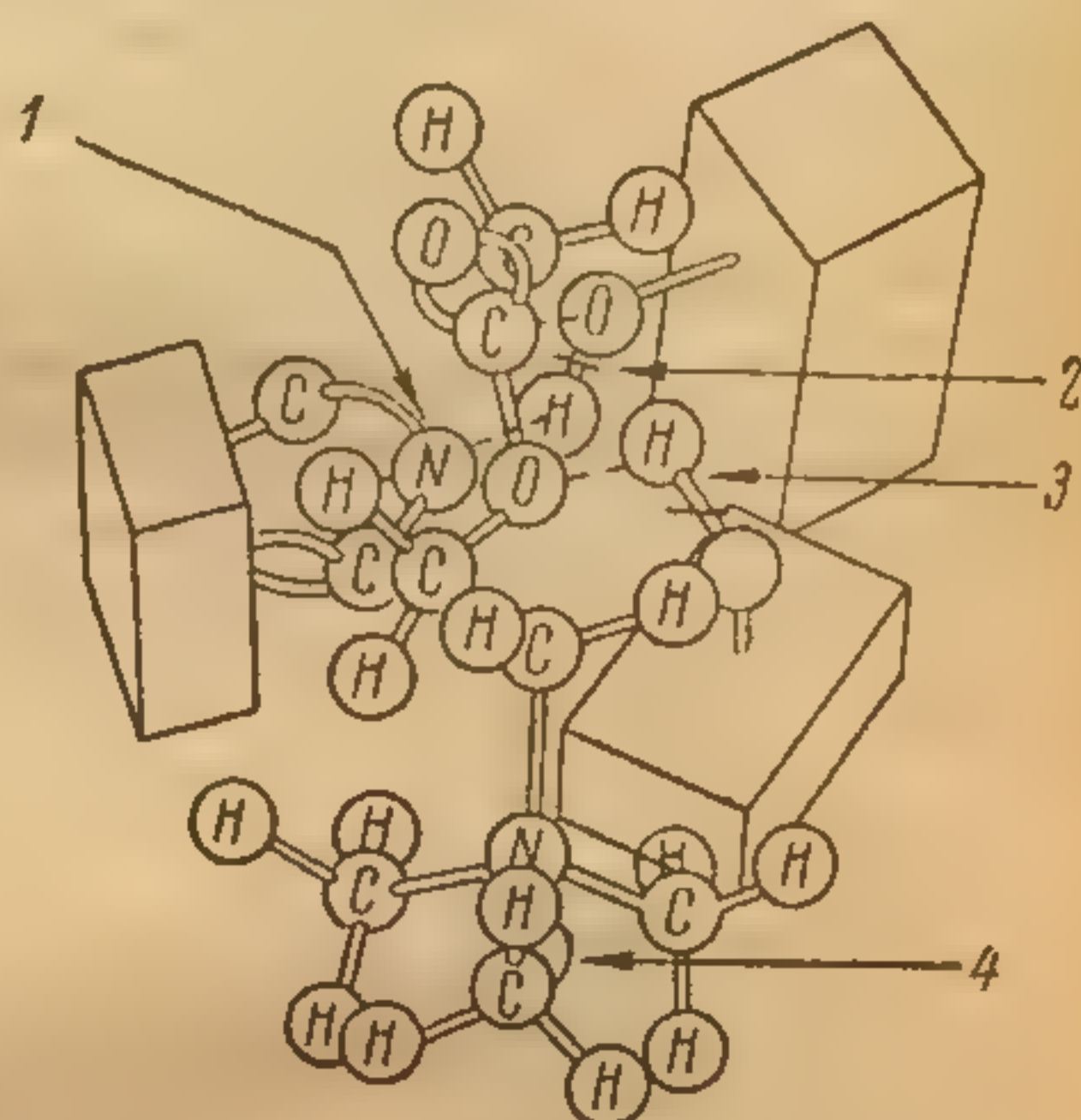


Рис. 11. Структура комплекса холинэстеразы — ацетилхолин (Krupka, Laidler, 1961).

1 — основная группа (азот имидазола); 2 — гидроксил серина; 3 — кислотная группа; 4 — анионный центр.

должен быть расположен несколько дальше от анионного центра, чем азот имидазола. Только при этом условии возможно одновременное взаимодействие соединений типа I с анионным центром и основной группой.

Все эти соображения послужили основанием для предложения схемы, в которой представлено пространственное расположение функциональных групп, составляющих активную поверхность холинэстеразы (рис. 10). Вероятно, все эти группы расположены на различных полипептидных цепях молекулы фермента и их строгая взаимная ориентация происходит только тогда, когда фермент вступает во взаимодействие с субстратом. Можно думать, что активная поверхность трипсина, химотрипсина и некоторых других ферментов имеет аналогичное строение, за исключением того, что они лишены анионного центра.

На первой стадии взаимодействия холинэстеразы с ацетилхолином образуется фермент-субстратный комплекс, который схематически изображен на рис. 11. Образование этого ком-



плекса обеспечивают следующие силы: электростатическая связь между анионным центром фермента и положительно заряженным азотом ацетилхолина; электростатическое притяжение между водородом кислотной группы и эфирным кислородом ацетилхолина, а также между кислородом серинового гидроксила и углеродом карбонильной группы ацетилхолина, и не показанные на схеме ван-дер-ваальсовы силы, связывающие метильные группы ацетилхолина с соответствующими участками молекулы фермента. Кроме этого, существует притяжение между азотом имидазола и водородом серинового гидроксила, а также между водородом кислотной группы и кислородом серинового гидроксила.

Образование комплекса обеспечивает необходимое сближение субстрата с функциональными группами активной поверхности фермента и тем самым дает возможность протеканию химической реакции между ними.

При этом три связи рвутся и три образуются вновь. Рвутся связи между углеродом и эфирным кислородом в ацетилхолине, между кислородом и водородом в сериновом гидроксиле, и от кислотной группы отрывается водород. Возникают новые связи между углеродом ацетильного остатка и кислородом серинового гидроксила, между кислородом остатка холина и водородом кислотной группы, между водородом серинового гидроксила и остатком кислотной группы. В результате этой реакции отщепляется холин и образуется ацетилированный фермент (рис. 12). Здесь важно подчеркнуть, что ацетилированию подвергается кислород серинового гидроксила, а не азот имидазола, как предполагали ранее некоторые исследователи. Ацетилирование имидазола не происходит даже на промежуточных стадиях.

На последнем этапе происходит деацетилирование под действием воды. Участие воды в этом процессе схематически изображено на рис. 12. Можно предположить, что азот имидазола притягивает к себе водород воды и тем самым облегчает атаку гидроксила воды на карбонильный углерод ацетильного остатка. В ходе деацетилирования так же, как и на предыдущей стадии, три связи рвутся и три образуются вновь. Рвутся связи между водородом и гидроксилом в молекуле воды, между

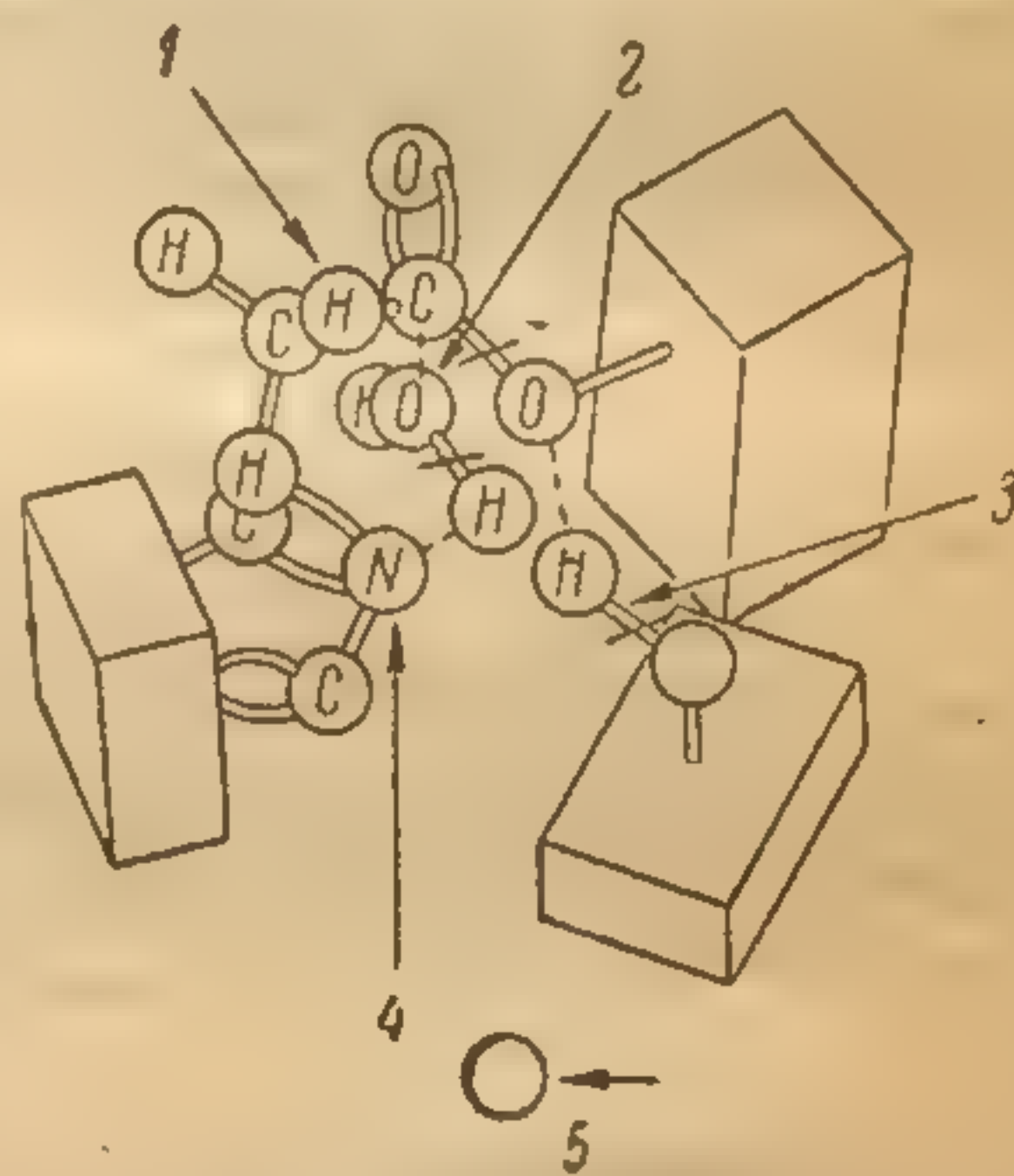


Рис. 12. Структура ацетилированной холинэстеразы (Кирка, Laidler, 1961).

1 — ацетильная группа; 2 — молекула воды; 3 — кислотная группа; 4 — основная группа (азот имидазола); 5 — анионный центр.



кислородом серинового гидроксила и углеродом ацетильного остатка, водород отрывается от кислотной группы. Новые связи возникают между гидроксилом воды и углеродом ацетильного остатка (при этом образуется уксусная кислота), между водородом кислотной группы и кислородом серинового гидроксила и между водородом воды и остатком кислотной группы. Образовавшаяся в результате деацетилирования уксусная кислота уходит, и остается исходный активный фермент (см. рис. 10).

Предложенная схема хорошо объясняет механизм тормозящего действия ингибиторов типа цис-2-диметиламиноциклогексанола, которые за счет анионного центра и кислотной группы присоединяются к ацетилированному ферменту и тем самым блокируют процесс деацетилирования. Точно такой же механизм лежит в основе тормозящего эффекта избытка ацетилхолина: он тоже тормозит процесс деацетилирования, вступая во взаимодействие с ацетилированным ферментом. Такая гипотеза позволяет отбросить недостаточно обоснованные допущения о существовании двух анионных центров в молекуле истинной холинэстеразы или о необычной ориентации субстрата на активной поверхности фермента (см. выше).

В приведенных здесь двух объединенных схемах эстеразного катализа (схема Спенсера и Стартеванта и схема Крупки и Лейдлера) имеется одна важная общая черта. Согласно этим схемам, имидазол не вступает ни в какие промежуточные реакции с субстратом; вместе с тем, он выполняет очень важную функцию, а именно активирует сериновый гидроксил в реакции ацетилирования фермента и активирует молекулу воды в реакции деацетилирования.

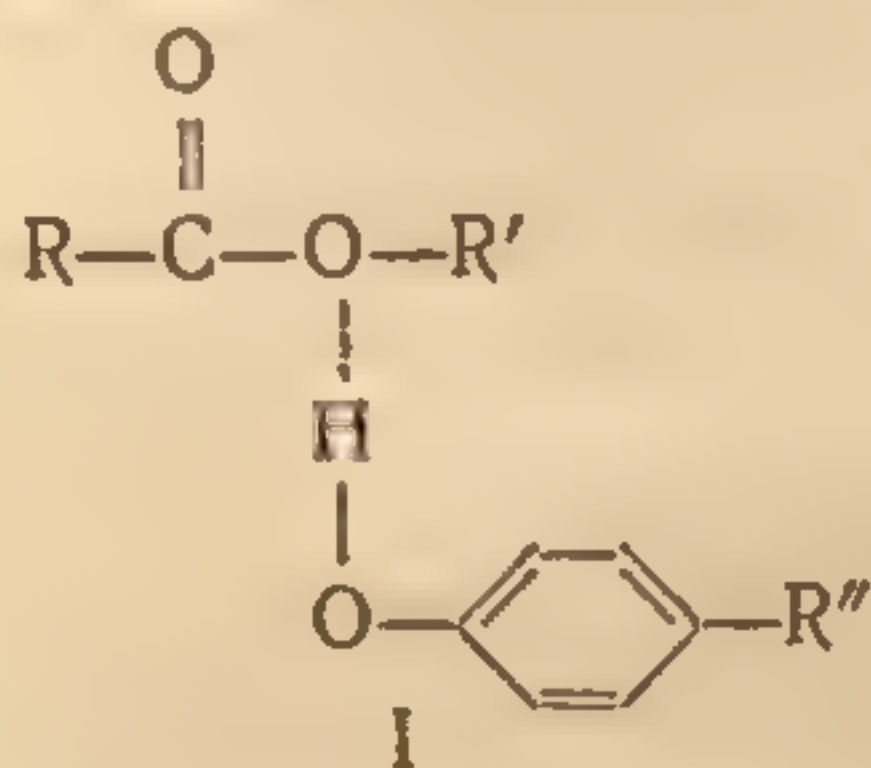
Основное положительное значение схем, подобных приведенным выше, состоит в том, что они построены с учетом реальных фактов, полученных экспериментально, и что с их помощью можно объяснить все или почти все явления, наблюдаемые при эстеразном катализе.

#### УЧАСТИЕ ФЕНОЛЬНЫХ И ДРУГИХ ГРУПП В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ЭСТЕРАЗ

Вероятно, имидазол и серин не исчерпывают всех возможных реактивных групп в активной поверхности эстеразы. Выше упоминалось, что в эстеразном центре должна существовать группа с  $pK = 8,5-9,5$ , не столь характерная для фермента, как имидазольная группа. В схеме Крупки и Лейдлера эта группа обозначена как кислотная. По мнению Бергмана (1958), эта группа представляет собой фенольный гидроксил тирозина. Ее роль сводится к тому, что она обеспечивает электрофильную атаку на эфирный кислород субстрата, образуя с этим кислородом водородную связь (I). В результате кислород становится



подвижным, и разрыв эфирной связи облегчается. Если субстратом действия фермента служит S-эфир, например ацетилтиохолин, возникновение комплекса I становится маловероятным, так как сера неохотно образует водородную связь.



Следовательно, в гидролизе S-эфиров электрофильная группа фермента (фенольный гидроксил) не принимает участия. Это предположение хорошо объясняет уже отмеченный факт, что ферментативный гидролиз ацетилтиохолина и других S-эфиров не имеет четкого рН-оптимума: с увеличением рН от 8,0 до 10—11 скорость их гидролиза не меняется.

О возможной роли фенольного гидроксила в реакции взаимодействия эстеразы с фосфорорганическими ингибиторами говорят исследования В. И. Розенгарта и Н. В. Карташевой (1959), выполненные на очищенной печеночной эстеразе. Авторы исследовали при различном рН ультрафиолетовый спектр поглощения ферментного белка до и после обработки его тетраэтилпирофосфатом. Было показано, что инактивация фермента сопровождается достоверными изменениями поглощения, свидетельствующими об уменьшении числа свободных фенольных групп тирозина в белке.

Интерес к фенольным соединениям в связи с изучением эстеразного катализа состоит еще в том, что известна способность некоторых фенолов, и особенно полифенолов, легко реагировать с фосфорорганическими ингибиторами (Jandorf et al., 1952; Berry et al., 1955). Эти данные навели на мысль о возможности взаимодействия фенолов не только с ингибиторами, но и с субстратами действия эстераз. Проведенные исследования (В. И. Розенгарт, 1960, 1962) показали, что некоторые фенольные соединения обладают выраженной способностью катализировать гидролиз п-нитрофенилацетата, т. е. являются моделями эстеразы. Из изученных соединений наиболее активным оказался пирокатехин. Несколько слабее действовал гидрохинон и еще слабее резорцин. Слабой активностью обладал также фенол. Замена одного гидроксила пирокатехина на метильную группу (крезол) или метоксигруппу (гваякол) приводила к практически полной утрате каталитических свойств.

При дальнейшем развитии этих исследований (В. И. Розенгарт, 1961; В. И. Розенгарт и Л. В. Шепшелевич, 1962, 1963) выяснилось, что пирокатехин и некоторые сходные с ним полифе-



нолы катализируют гидролиз не только п-нитрофенилацетата, но и других сложных эфиров (ацетилтиохолин, флуоресцеин-диацетат и др.). Было также установлено, что обработка пирокатехина диизопропилфторфосфатом или тетраэтилпирофосфатом резко тормозит каталитическую активность, т. е. и в этом отношении пирокатехин ведет себя подобно эстеразе. Изучение механизма каталитического действия пирокатехина показало, что, так же как при эстеразном катализе, он состоит в образовании промежуточного ацетилированного производного — моноацетилпирокатехина, который затем спонтанно гидролизуется водой с образованием уксусной кислоты и исходного пирокатехина. Другой продукт гидролиза п-нитрофенилацетата — п-нитрофенол отщепляется раньше при реакции ацетилирования пирокатехина.

В последнее время появились данные об участии триптофана в активном центре трипсина и химотрипсина. Эти данные основаны главным образом на сравнительном исследовании изменений спектра ультрафиолетового поглощения ферментных белков после обработки диизопропилфторфосфатом и веществами, избирательно окисляющими триптофан, такими, как N-бромсукцинимид или N-бромацетамид (Wooton, Hess, 1960; Viswanatha, Lawson, 1961). Наиболее обстоятельные исследования в этом отношении были выполнены Симоном (Simon, 1962а, б). Он обрабатывал трипсин и химотрипсин диизопропилфторфосфатом, после чего подвергал их перевариванию пепсином и полученные пептиды детально исследовал с помощью дифференциальной спектрофотометрии и хроматографии на бумаге. Автор использовал ранее описанный прием (Patchornik et al., 1958), позволяющий с помощью мягкого окисления N-бромсукцинимидом избирательно разрушать триптофан в молекуле белка. В результате оказалось, что предварительная обработка трипсина диизопропилфторфосфатом защищает триптофан от последующего окисления N-бромсукцинимидом. Среди продуктов пептического гидролиза трипсина, обработанного диизопропилфторфосфатом, были найдены пептиды, которые содержали триптофан и фосфор. Кроме триптофана, в этих пептидах были обнаружены в эквимолекулярных количествах лейцин, валин и серин. Интересно также, что продукты пептического гидролиза, полученные после обработки N-бромсукцинимидом нативного трипсина и трипсина, подвергнутого воздействию диизопропилфторфосфата, занимали различное положение на хроматограмме.

Необходимо подчеркнуть, что хотя результаты этих опытов достаточно убедительны, так как известно, что диизопропилфторфосфат избирательно реагирует с активным центром трипсина, а N-бромсукцинимид столь же избирательно взаимодействует с триптофаном, тем не менее их можно рассматривать



лишь как косвенное указание на возможное участие триптофана в активном центре фермента. Для большей наглядности следовало бы прямыми опытами показать, что фосфорильная группа фосфорорганического ингибитора соединена с остатком триптофана, как это было показано в отношении серина.

Необходимо упомянуть еще о нескольких соединениях участие которых в осуществлении эстеразного катализа может быть подвергнуто обсуждению Геро и Уитроу (Gero, Withrow, 1957) установили, что лизин обладает способностью катализировать гидролиз трибутирина, т. е. является моделью эстеразы. Исследованиями В. И. Розенгарта (1960) каталитическая способность лизина была подтверждена на примере другого сложного эфира — п-нитрофенилацетата.

Стюарт и Уэлле (Stewart, Ouellet, 1959) показали, что метиловый эфир лизина тоже катализирует гидролиз п-нитрофенилацетата. При изучении кинетики гидролиза этого субстрата трипсином они пришли к заключению, что в состав активного центра трипсина должна входить алифатическая аминогруппа, возможным носителем которой является лизин.

Рей и др. (Ray et al., 1960) подвергали химотрипсин постепенному фотоокислению и производили полный количественный анализ аминокислотного состава полученных продуктов. При этом было показано, что скорость потери ферментативной активности соответствует скорости окисления не только гистидина, что было известно ранее, но и метионина. Из этого был сделан вывод, что метионин входит в состав активного центра химотрипсина. В дальнейшем участие метионина в активном центре химотрипсина получило дополнительное экспериментальное подтверждение (Lawson, Schramm, 1962). Оказалось, что обработка химотрипсина п-нитрофенилбромацетил- $\alpha$ -аминоизобутиратом приводила к частичной инаktivации фермента. Анализ гидролизата такого фермента показал, что единственное отличие его от контрольного препарата состояло в том, что один остаток метионина был разрушен. Предварительная обработка химотрипсина диизопропилфторфосфатом защищала метионин от разрушения.

Наконец, следует указать на интересные работы Хейльброн (Heilbronn, 1962a, б) и Свенсмарка (Svensmark, 1961; Svensmark, Kristensen, 1963), которые показали, что обработка очищенной холинэстеразы из лошадиной сыворотки бактериальной сиалидазой изменяет электрофоретическую подвижность фермента, хотя и не влияет на его активность. Был сделан вывод, что холинэстераза сыворотки является сиалопротеидом. В очищенной холинэстеразе из лошадиной сыворотки было обнаружено около 3% сиаловой кислоты.

Все приведенные выше данные об участии других групп (кроме имидазола и серина) в активном центре эстераз носят



косвенный характер, и на их основании нельзя сделать категорических выводов о конкретной роли той или иной группировки в осуществлении эстеразного катализа. Однако эти данные проливают дополнительный свет на механизм реакций, катализируемых эстеразами, и дальнейшие исследования в этом направлении, безусловно, являются перспективными.

### АНИОННЫЙ ЦЕНТР

Анионный центр, т. е. группировка, несущая отрицательный заряд, имеется только в активной поверхности холинэстеразы и отсутствует у других эстераз. Это вытекает из приведенных в начале этой главы соображений об избирательной способности холинэстеразы катализировать гидролиз эфиров холина, имеющих «катионную головку», и о влиянии рН на способность холинэстеразы взаимодействовать с различными ионизированными субстратами и ингибиторами. Никаких прямых экспериментальных данных о химической природе анионного центра и о величине его рК в доступной нам литературе обнаружить не удалось. Но при обсуждении возможных групп, входящих в анионный центр, следует помнить, что в белке существует очень мало группировок, которые имели бы отрицательный заряд при нейтральном рН. К их числу в первую очередь следует отнести  $\beta$ -карбоксил аспарагиновой кислоты ( $pK = 3,0-4,5$ ) и  $\gamma$ -карбоксил глутаминовой кислоты ( $pK = 4,2-4,5$ ). Вероятно, какая-нибудь из этих групп и составляет анионный центр холинэстеразы.

\* \* \*

В данной главе были рассмотрены важнейшие литературные данные, касающиеся химического строения активных центров эстераз. В заключение необходимо подчеркнуть, что задача, которая стояла перед нами, была достаточно ограниченной. Под активным центром мы понимаем тот участок поверхности, на котором располагается и активируется субстрат во время ферментативного процесса. Химические группировки, составляющие активный центр, должны обеспечить специфическую реакционную способность фермента к тому виду связи, на который он действует, в данном случае к сложноэфирной связи. От таких группировок нельзя ожидать строгой избирательности по отношению к отдельным субстратам. Поэтому не удивительно, что самые различные эстеразы, а также протеазы, обладающие эстеразной активностью, имеют весьма сходные активные центры. Вместе с тем, ферменты, входящие в эту большую группу, резко отличаются друг от друга по многим свойствам, особенно по субстратной специфичности. Это ярко видно на примере разных холинэстераз, которые делятся не только на две боль-



шие группы (истинная и ложная), но и внутри этих групп существенно отличаются друг от друга в зависимости от происхождения. Совершенно очевидно, что индивидуальные свойства того или иного фермента определяются не только структурой его активной поверхности, но всеми особенностями строения его молекулы. Мы почти ничего не знаем в настоящее время о строении молекулы различных видов холинэстеразы и поэтому ничего не можем сказать о том, какие химические свойства отличают ложную холинэстеразу от истинной, холинэстеразы различного происхождения друг от друга и т. д.

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИЗОЛИРОВАНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Литература, посвященная описанию методов определения активности холинэстеразы, чрезвычайно обширна. Это является следствием того, что интерес к холинэстеразе проявляют не только биохимики, специально занимающиеся исследованием свойств ферментов, но и фармакологи, токсикологи, клиницисты, энтомологи и представители ряда других специальностей. Естественно, что при таком широком внимании к этому ферменту разрабатываются и описываются самые разнообразные методы его определения применительно к тем задачам, которые ставил перед собой исследователь. Многие из описанных методов отличаются универсальностью и могут быть использованы в самых различных условиях, другие имеют лишь ограниченное применение и приспособлены для решения частных вопросов. Методы отличаются друг от друга также по принципам, положенным в их основу, и по применяемой аппаратуре.

Мы предлагаем следующую классификацию методов определения холинэстеразы, описанных в литературе к настоящему времени.

I. Методы, основанные на определении количества кислоты, выделившейся при гидролизе субстрата.

1. Манометрические.

2. Титрометрические:

а) выполняемые путем титрования с индикатором;

б) выполняемые путем потенциометрического титрования.

3. Фотометрические.

4. pH-Метрические.

II. Методы, основанные на определении количества других продуктов гидролиза субстрата:

1) тиохолиновые;

2) с использованием специальных субстратов.



III. Методы, основанные на определении количества неразложившегося ацетилхолина:

- 1) биологическим путем;
- 2) химическим путем.

IV. Ультрамикрометоды.

V. Экспресс-методы.

VI. Гистохимические методы.

Эта классификация не безупречна в том смысле, что она построена на основе не одного, а двух различных критериев: первые три группы методов (I, II и III) классифицированы по принципу определения, лежащему в их основе. Что же касается остальных трех групп (IV, V и VI), то они разделены по задачам, которые с их помощью могут быть решены; химические принципы, на которых они базируются, являются различными и могут относиться к любой из первых трех групп.

I.1. Манометрический метод определения активности холинэстеразы впервые описал Аммон (Ammon, 1933); он применил для этой цели аппарат Варбурга, широко используемый в биохимических и других лабораториях (подробное описание техники работы с аппаратом Варбурга см.: Умбрайт и др. (1951). Очень удобную и простую модификацию манометрического метода предложил А. А. Покровский (1950), который использовал для этой цели несколько видоизмененный аппарат Баркрофта, обычно применяемый для анализа газов крови.

I.2. В титрометрических методах количество образующейся кислоты определяют титрованием щелочью, которое может производиться как с помощью индикатора (а), так и потенциометрически (б). Существует много модификаций методов, основанных на индикаторном титровании.

В качестве примеров могут быть названы методы С. Р. Зубковой и Т. В. Правдич-Неминской (1947), Т. В. Правдич-Неминской (1949), Hall, Lukas (1937). При замене индикаторного титрования потенциометрическим об изменении pH судят не по цвету индикатора, а по показаниям pH-метра (Chouteau et al., 1956; Delaunois, 1962).

I.3. В фотометрических методах количество образовавшейся кислоты определяют не титрованием, а фотометрически по изменению цвета индикатора. Известно много модификаций этих методов (Г. А. Паносян, 1958; Reinhold et al., 1953; Gregoire et al., 1955; Caraway, 1956; Biggs et al., 1958; Winter, 1960).

Несколько особняком в этой группе стоит метод П. И. Борова и В. И. Розенгарта (1950), который основан на определении времени, необходимого для образования стандартного количества уксусной кислоты из избытка ацетилхолина. Критерием здесь служит изменение окраски крезолового красного. Сходный метод предложил А. А. Покровский (1960), который



вместо крезолового красного использовал бромтимоловый синий и приспособил метод для анализа небольших количеств ткани.

I.4. В рН-метрических методах изменение кислотности определяют не по цвету индикатора, а путем прямого определения рН исследуемого раствора. Наиболее распространенным методом из этой группы является метод Мичела (Michel, 1949).

Известен ряд модификаций этого метода — например, методика Клане и Андре (Clanet, André, 1958) или модификация Таммелина (Tammelin, 1953).

II.1. В методах, объединенных в эту группу, субстратом служит ацетилтиохолин. При инкубации его с ферментом образуется тиохолин, количество которого и служит мерой активности фермента. Известно несколько методик, основанных на этом принципе (Augustinsson, 1955; McOsker, Daniel, 1959; Ellman et al., 1961).

II.2. В эту группу входят методы, в которых в качестве субстрата используются нехолиновые эфиры. Наиболее распространенным субстратом служит индофенилацетат (Kramer, Gamson, 1958). В последнее время в качестве субстрата предложен о-нитрофенилбутират (Main, 1961; Main et al., 1961).

III. Рассмотренные до сих пор методы основаны на количественном определении тех или иных продуктов, образующихся при гидролизе субстратов под действием холинэстеразы. В отличие от этого, данная группа объединяет методы, в которых определяют не продукты реакции, а неразложившийся ацетилхолин. Это определение может быть осуществлено биологическим или химическим путем.

III.1. В последнее время биологическое определение активности холинэстеразы применяется очень редко. Подробное описание биологических методов можно найти в работах М. Я. Михельсона (1946а, б; 1948).

III.2. Методы определения активности холинэстеразы, основанные на химическом определении ацетилхолина (Hestrin, 1949), оставшегося нерасщепленным после инкубации с ферментом, имеют ряд преимуществ перед другими методиками. Они чрезвычайно просты технически, дают хорошо воспроизводимые результаты, позволяют работать в любых пределах рН и в любых биологических средах.

Описанные выше методы (группы I, II и III) практически исчерпывают все известные в настоящее время принципы, лежащие в основе количественного определения холинэстеразы. Методы, изложенные ниже и разделенные на три самостоятельные группы, основаны на тех же принципах, но они настолько отличаются по задачам, которые решаются с их помощью, и по



технике определения, что мы сочли целесообразным выделить их в самостоятельные разделы.

IV. Эта группа объединяет ультрамикрометоды, позволяющие надежно определять активность холинэстеразы в чрезвычайно малых количествах ткани, измеряемых миллионными долями миллиграмма. Чаще всего эти методы базируются на манометрическом определении количества кислоты, образующейся при гидролизе ацетилхолина. Чувствительность и точность этих методов были доведены до такой степени, что с их помощью стало возможным определение активности фермента не только в индивидуальных нервных клетках, имеющих сухой вес около  $5 \cdot 10^{-3}$  мкг, но и в отдельных компонентах нейрона — дендритах, аксоне, ядре, весом порядка  $10^{-5}$  мкг.

V. Определение активности холинэстеразы крови нередко используется в качестве диагностической пробы для выявления интоксикации фосфорорганическими и другими ингибиторами холинэстеразы. В литературе описано значительное число пригодных для этой цели быстрых упрощенных методов, которые дают, правда, лишь ориентировочное представление об активности фермента, но зато не требуют почти никакого оборудования и могут быть выполнены в любых условиях.

Один из лучших экспресс-методов предложен Херцфельдом и Штумпфом (Herzfeld, Stumpf, 1955). Метод основан на применении специально приготовленной индикаторной бумаги.

Аналогичный метод, но выполняемый не на индикаторной бумаге, а в пробирке, описали Дейвис и Николс (Davies, Nichols, 1955). Удобный метод, пригодный для полевых условий, описали Лимпероз и Ранга (Limperos, Ranta, 1953). В качестве экспресс-метода может быть использована также описанная выше методика А. А. Покровского (1960).

VI. До сих пор речь шла о количественных методах определения холинэстеразы, дающих более или менее точное количественное представление о суммарной активности фермента во взятых для анализа объеме или навеске ткани. Методы, объединенные в данную группу, принципиально отличаются от описанных выше тем, что в их задачу входит не определение количества фермента, а лишь выявление его, определение его локализации в микроструктурах тканей. Обзор и описание гистохимических методов определения холинэстеразы можно найти в монографиях В. В. Португалова (1955) и Пирса (1962).

В этой главе мы не ставили перед собой задачу — перечислить все описанные в литературе методы определения холинэстеразы. Мы попытались дать их классификацию и ограничились ссылками лишь на немногие отдельные методы, являющиеся наиболее типичными представителями каждой группы.

Получение очищенной смеси, в которой быть осуществлено сменяемых в настоящее относятся: дробные нейтральными солями, ление на самых ра ультрацентрифугирован

др. Процесс очистки фактору очистки, пред активности данной ф ткани, и по общей активности дает представление о т ходной тканью очищен тивность показывает, ка общей ферментативной в очищенном виде.

В литературе описан как истинной, так и лож

Первую попытку выделения органа предпринял Sohn, Lederer, 1939). Им ко-нибудь очищенном ви рии был разработан б Nachmansohn, 1947), с парат 75-кратной очистки этого метода (осадка с помощью высор вела к получению препаратов которых сохранялось

В последнее время очистки холинэстеразы вала возможность получения 10% (Hargreaves, 1953a) удалось получить. В дальнейшем метод

Надежные методы очистки были разработаны Козна. В пер ки, 1953a) удалось получить. В дальнейшем метод фермента. При этом

С. Н. Голиков, В.



## ОЧИСТКА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Получение очищенных препаратов холинэстеразы, т. е. выделение индивидуального ферментного белка из сложной белковой смеси, в которой он находится в органах и тканях, может быть осуществлено с помощью самых различных методов, применяемых в настоящее время для разделения белков. К ним относятся: дробное осаждение сульфатом аммония, другими нейтральными солями или спиртом, хроматографическое разделение на самых различных сорбентах, дифференциальное ультрацентрифугирование, препаративный электрофорез и др.

Процесс очистки контролируют по двум показателям: по фактору очистки, представляющему собой отношение удельной активности данной фракции к удельной активности исходной ткани, и по общей активности каждой фракции. Фактор очистки дает представление о том, во сколько раз по сравнению с исходной тканью очищен фермент на каждом этапе, а общая активность показывает, каков выход фермента, т. е. какую долю общей ферментативной активности (в %) удалось получить в очищенном виде.

В литературе описано значительное число методов очистки как истинной, так и ложной холинэстеразы разного происхождения.

Первую попытку выделения холинэстеразы из электрического органа предприняли Нахманзон и Ледерер (Nachmansohn, Lederer, 1939). Им не удалось получить фермент в сколько-нибудь очищенном виде. В дальнейшем в той же лаборатории был разработан более совершенный метод (Rothenberg, Nachmansohn, 1947), с помощью которого удалось получить препарат 75-кратной очистки с выходом 15%. Некоторая модификация этого метода (осаждение при различном pH, отделение осадка с помощью высокоскоростного центрифугирования) привела к получению препаратов фермента 200-кратной очистки, в которых сохранялось до 20% исходной активности (Lawler, 1959).

В последнее время была описана упрощенная процедура очистки холинэстеразы из электрического органа, которая давала возможность получать препараты 200-кратной очистки с выходом 10% (Hargreaves et al., 1963).

Надежные методы очистки холинэстеразы из бычьих эритроцитов были разработаны голландскими исследователями под руководством Коэна. В первом варианте метода (Cohen, Warringa, 1953a) удалось получить препараты 250—400-кратной очистки. В дальнейшем метод был усовершенствован (Warringa, Cohen, 1955). При этом была достигнута 3000-кратная очистка фермента.



Цитл и др. (Zittle et al., 1953) разработали метод выделения холинэстеразы из эритроцитов человека. Для перевода фермента в растворимое состояние они использовали твин-20 (полиоксиметиленсорбитанмонолаурат). Конечный продукт содержал до 20% исходной активности и был очищен в 240 раз по сравнению с исходными эритроцитами.

Первую попытку очистить холинэстеразу сыворотки предприняли Стедман и Стедман (Stedman, Stedman, 1935). Им удалось добиться 50—100-кратной очистки фермента из лошадиной сыворотки. В 1944 г. был опубликован значительно более совершенный метод (Strelitz, 1944). Этим методом удалось получить препарат, очищенный в 5000 раз по сравнению с исходной сывороткой, однако выход фермента не превышал 5%.

Группа Садженера (Surgenor et al., 1949; Surgenor, Ellis, 1954) использовала в качестве исходного материала не цельную сыворотку, а так называемую фракцию IV-4 из плазмы крови человека, получение которой было разработано Коном и др. (Cohn et al., 1946) на основе дробного осаждения спиртом на холоду. Садженер и сотрудники подвергли эту фракцию ультрацентрифугированию для удаления липопroteinов, а затем многократно обрабатывали ее спиртом при низкой температуре и различном pH (3,8—4,9). Лучшие их препараты были очищены в 3400 раз.

Выдающихся результатов в очистке холинэстеразы лошадиной сыворотки добились Янс и Коэн (Jansz, Cohen, 1962). Они подвергали сыворотку фракционированному осаждению сульфатом аммония, активные фракции разделяли ультрацентрифугированием, а на последних этапах производили дополнительное разделение путем зонального электрофореза на колонках из целлюлозы. Этим методом при одномоментной обработке 27 л сыворотки им удалось получить 10 мл концентрированного раствора фермента, очищенного в 14 000 раз и содержащего 10% исходной активности. Повторный электрофорез на целлюлозе и исследование на аналитической ультрацентрифуге показали полную гомогенность ферментного белка.

Из изложенного видно, что каждое новое усовершенствование, вводимое в методику очистки холинэстеразы, приводило к получению препаратов, обладающих все более высокой удельной активностью. Следовательно, нет никакой уверенности в том, что даже наиболее чистые из этих препаратов представляют собой индивидуальный ферментный белок в совершенно изолированном виде. К сожалению, холинэстеразу не удалось получить в кристаллической форме, и следовательно, не было возможности использовать перекристаллизацию в качестве метода очистки и критерия чистоты ферментного белка.

АНТИХОЛИН

Холинэстераза, других ферментов, ектом исследования гов и, главным обр объяснить то обстоя сятилетия в мирово бот, посвященных и тивность холинэстер обладали способнос Среди них оказались строения с весьма ствами.

Одной способно чтобы отнести то ил веществам. Для это ствие было очень ре чрезвычайно низкой или, чтобы способн играла определяющ ствия вещества. На вим антихолинэстер как морфин и много местноанестезируюи подобного действия многие другие, одн тельно высоких кон но положить в осно речисленным соеди веществам (М. Я. В то же время антихолинэстеразы выше определению классам органичес логическим действ



## АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Холинэстераза, в отличие от подавляющего большинства других ферментов, с момента ее открытия в 1926 г. стала объектом исследования не только биохимиков, но также физиологов и, главным образом, фармакологов. Вероятно, этим можно объяснить то обстоятельство, что за истекшие почти четыре десятилетия в мировой литературе появилось огромное число работ, посвященных изучению действия различных веществ на активность холинэстеразы. Многие из исследованных соединений обладали способностью подавлять активность этого фермента. Среди них оказались вещества самого различного химического строения с весьма разнообразными фармакологическими свойствами.

Одной способности угнетать холинэстеразу недостаточно, чтобы отнести то или иное соединение к антихолинэстеразным веществам. Для этого нужно, чтобы антихолинэстеразное действие было очень резко выраженным, т. е. проявлялось бы при чрезвычайно низкой концентрации (порядка  $10^{-6}$  М и ниже), или, чтобы способность подавлять активность холинэстеразы играла определяющую роль в механизме биологического действия вещества. Например, известно, что достаточно отчетливым антихолинэстеразным действием обладают такие вещества, как морфин и многие алкалоиды его группы, наркотики, многие местноанестезирующие вещества, стрихнин, вещества кураре-подобного действия, азотистые иприты, метиленовый синий и многие другие, однако это действие они проявляют в сравнительно высоких концентрациях, и вряд ли эту способность можно положить в основу их биологического действия. Поэтому перечисленные соединения нельзя отнести к антихолинэстеразным веществам (М. Я. Михельсон и др., 1961а).

В то же время известно очень большое число и собственно антихолинэстеразных веществ, соответствующих приведенному выше определению. Они тоже относятся к самым различным классам органических соединений, но отличаются сходным биологическим действием, так как в его основе лежит одно и то



же свойство — способность подавлять активность холинэстеразы.

**Классификация антихолинэстеразных веществ.** Наилучшим принципом классификации всяких химических веществ является химический принцип, т. е. разделение по признакам, относящимся к особенностям химической структуры. Применение этого принципа для классификации антихолинэстеразных веществ стало возможным благодаря тому, что в последние годы в общих чертах (с разной степенью достоверности для разных соединений) был изучен химический механизм действия этих веществ на холинэстеразу.

В настоящее время большую часть антихолинэстеразных веществ можно разбить на три класса в зависимости от той функциональной химической группы, которая в основном определяет их антихолинэстеразные свойства. Это: 1) четвертичные аммониевые соединения; 2) сложные эфиры карбаминовой кислоты (уретаны, карбаматы); 3) фосфорорганические соединения (ФОС).

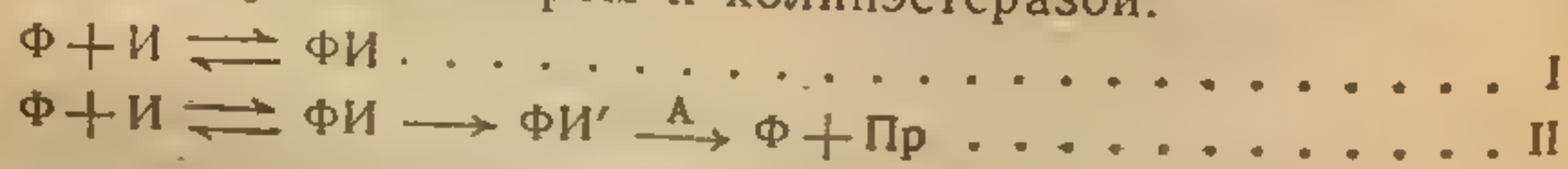
К этим классам нужно добавить еще один — группу прочих антихолинэстеразных веществ, механизм действия которых на холинэстеразу не всегда достаточно ясен и о которых нельзя с уверенностью сказать, что в основе их биологической активности лежит способность угнетать холинэстеразу.

В подавляющем большинстве руководств, монографий и обзоров, посвященных антихолинэстеразным веществам, приводится разделение этих веществ на «обратимые» и «необратимые» ингибиторы холинэстеразы. К обратимым относят четвертичные соединения и эфиры карбаминовой кислоты, к необратимым — фосфорорганические соединения. Такое разделение не может быть принято без некоторых оговорок.

Прежде всего, не совсем точно относить определение «обратимый» или «необратимый» к понятию «ингибитор». Применительно к данному случаю обратимой или необратимой может быть только реакция, в которую вступают ингибитор и фермент, т. е. реакция угнетения фермента. Следовательно, правильнее было бы говорить не об обратимых или необратимых ингибиторах, а об ингибиторах, вызывающих обратимое или необратимое торможение холинэстеразы.

Далее, по существу этого разделения.

В схематическом виде можно представить себе два типа реакции между ингибитором и холинэстеразой:



Здесь Ф — активный фермент (холинэстераза); И — ингибитор; ФИ — неактивный комплекс ингибитора с ферментом; ФИ' — химически измененный комплекс; А — вода или другой



нуклеофильный реагент, под действием которого происходит дальнейшее превращение измененного комплекса  $ФИ'$ ; Пр — продукты превращения ингибитора.

Когда реакция протекает по типу I, образующийся комплекс не подвергается дальнейшим превращениям, и здесь мы встречаемся с типичным примером обратимой реакции, при которой, как правило, достаточно быстро наступает состояние равновесия. В этом состоянии в растворе присутствуют как исходные вещества, так и продукт реакции, и концентрации всех ингредиентов зависят от прочности комплекса. Если комплекс прочен, то равновесие сдвинуто вправо, большая часть фермента связана, т. е. имеет место инактивация. Однако, если каким-нибудь способом удалить из системы свободный ингибитор (например, путем диализа или отмывания), то реакция начнет протекать влево и будет идти до тех пор, пока весь комплекс не распадется, в результате чего все количество фермента восстановит свою активность.

Если же реакция протекает по типу II, то сначала комплекс  $ФИ$  претерпевает химические изменения, превращаясь в  $ФИ'$ , а затем  $ФИ'$  под действием воды или другого нуклеофильного реагента разрушается, в результате чего в конечном счете образуется исходный активный фермент, но исходный ингибитор не восстанавливается, а накапливаются продукты его превращения. Разумеется, первый этап этой реакции (образование обратимого комплекса фермент — ингибитор) подчиняется законам, описанным для реакции типа I; однако здесь не получается настоящей равновесной системы, так как комплекс  $ФИ$  все время уходит из круга реакции и весь процесс течет вправо. Как видно из схемы реакции, и в этом случае в конце концов образуется свободный фермент, но не в результате простого обращения реакции между ферментом и ингибитором, а как следствие дальнейших превращений комплекса  $ФИ$ .

Как будет показано ниже, только четвертичные аммониевые соединения реагируют с холинэстеразой по типу I, а карбаматы и ФОС вступают в реакцию по типу II. Следовательно, строго говоря, «обратимыми» ингибиторами можно считать только четвертичные соединения, а карбаматы и ФОС следует отнести к необратимым.

Однако между карбаматами и ФОС в их реакции с холинэстеразой есть существенное различие: последняя стадия процесса — превращение комплекса  $ФИ'$  под действием воды — в случае участия в этом комплексе карбаматов происходит, как правило, сравнительно быстро, а при наличии в нем ФОС — в большинстве случаев чрезвычайно медленно, иногда настолько медленно, что эту реакцию практически можно совсем не принимать в расчет. Поэтому по внешнему эффекту, т. е. по



скорости восстановления активности фермента, реакция холинэстеразы с карбаматами тоже может считаться обратимой.

Учитывая все изложенное, мы можем сохранить принятую в настоящее время классификацию, подразделяющую все антихолинэстеразные вещества на «обратимые», куда входят четвертичные соединения, карбаматы и некоторые другие вещества, и «необратимые», к которым относятся фосфорорганические ингибиторы.

Литература, посвященная механизму и особенностям действия разных веществ на холинэстеразу, чрезвычайно неравномерно распределена между отдельными группами ингибиторов. Она почти исчерпаема в отношении ФОС и сравнительно ограничена в отношении других ингибиторов. Поэтому неравномерным по объему будет и дальнейшее изложение материала об антихолинэстеразных свойствах различных соединений.

## «ОБРАТИМЫЕ» ИНГИБИТОРЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Данные о свойствах обратимых ингибиторов холинэстеразы неоднократно обобщались в литературе и получили достаточно полное отражение в ряде обзоров, монографий и руководств (Барлоу, 1959; М. Я. Михельсон, 1946, 1948, 1951, 1957, 1961a, d'Arcy, Taylor, 1962; Bergmann, 1958; Koelle, Gilman, 1949; Long, 1963; Nachmansohn, Wilson, 1951; Whittaker, 1951).

### ЧЕТВЕРТИЧНЫЕ АММОНИЕВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Способность четвертичных аммониевых соединений угнетать холинэстеразу основана на том, что содержащийся в этих соединениях положительно заряженный атом азота электростатически взаимодействует с анионным центром холинэстеразы и тем самым обеспечивает образование комплекса фермент — ингибитор. Поэтому даже такие просто построенные аммониевые производные, как тетраметиламмоний  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ , тетраэтиламмоний  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$ , холин  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  и другие, обладают некоторым антихолинэстеразным действием.

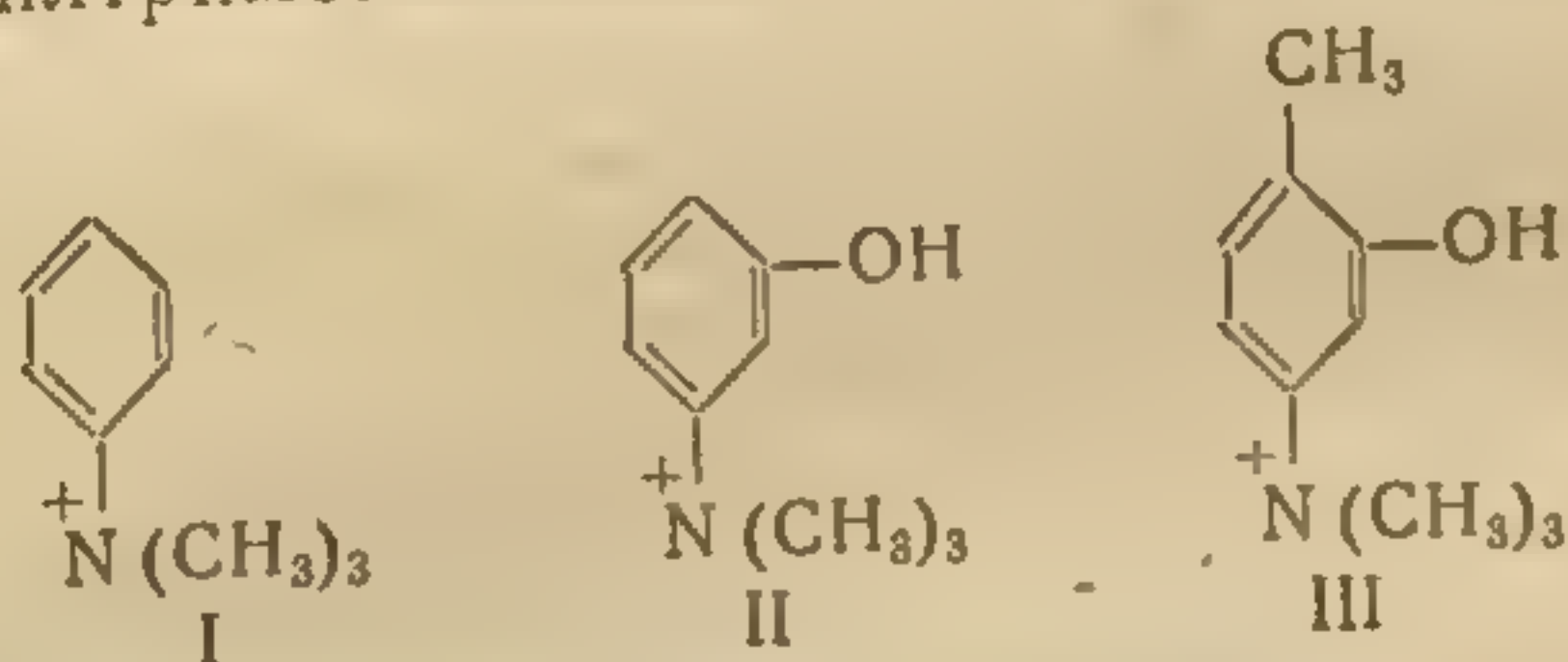
Сродство таких соединений к холинэстеразе очень невелико, образующийся комплекс непрочен, и поэтому здесь особенно ярко выражены конкурентные отношения с естественным субстратом холинэстеразы — ацетилхолином: увеличение концентрации субстрата резко снижает тормозящее действие ингибитора. Например, одно и то же количество тетраэтиламмония тормозит холинэстеразу на 47%, если концентрация субстрата составляет 0,001 М, и только на 5% при концентрации субстрата 0,015 М (Keusler, Elsner, 1951). В самое последнее время на



основании тщательно проведенных кинетических исследований А. П. Бресткин и др. (1963) пришли к выводу, что торможение холинэстеразы сыворотки холином не является строго конкурентным, а протекает по смешанному типу.

Во взаимодействии аммониевых производных с холинэстеразой, помимо заряда, важную роль играют пространственные, стерические отношения, которые определяют расположение молекулы ингибитора на поверхности фермента и обеспечивают возможность упрочнения комплекса за счет ван-дер-ваальсовых сил, действующих на коротком расстоянии. Это видно на примере даже просто построенных соединений. Так, тетраметиламмоний является более сильным ингибитором холинэстеразы, чем тетраэтиламмоний (Depierre, Martin, 1958), вероятно, потому, что первое из этих веществ ближе по строению к ацетилхолину и точнее соответствует активной поверхности фермента. Еще более выраженным антихолинэстеразным действием обладает холин (Wilson, 1952).

При исследовании производных триметиламмония типа  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  было установлено, что с увеличением длины цепи антихолинэстеразная активность возрастает (Coleman, Eley, 1962). Так, при  $n = 3$   $\text{pI}_{50}^1$  составлял 2,77, при  $n = 5$  — 3,40, при  $n = 7$  — 3,85, а при  $n = 9$  — 4,16. Дальнейшее усложнение молекулы триметиламмония сопровождалось еще большим усилением антихолинэстеразных свойств. В частности, существенное влияние оказало введение фенильного кольца. Если  $\text{I}_{50}$  триметиламмония равен  $1,5 \cdot 10^{-2}$  М (Wilson, 1952), то  $\text{I}_{50}$  фенилтриметиламмония (I) составляет  $4,4 \cdot 10^{-4}$  М (Wilson, Quan, 1958). Резкое увеличение антихолинэстеразной активности удалось вызвать введением гидроксильной группы и других заместителей в бензольное кольцо I. Так, 3-оксифенилтриметиламмоний (II) характеризовался  $\text{I}_{50} = 3,7 \cdot 10^{-6}$  М, а 4-метил-3-оксифенилтриметиламмоний (III)  $\text{I}_{50} = 1,2 \cdot 10^{-6}$  М.



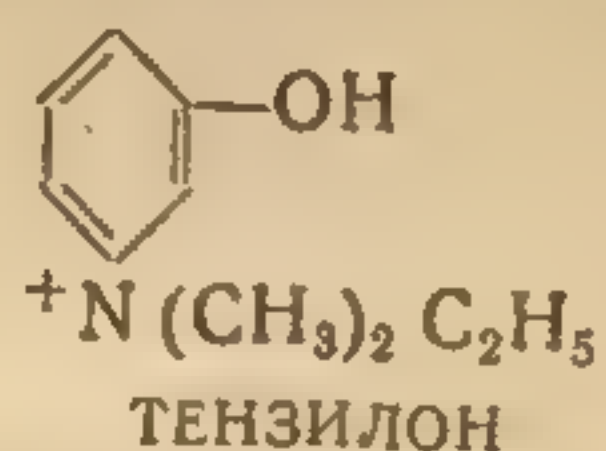
Расчеты показали, что вещество II образует в 120 раз более прочный комплекс с ферментом, чем вещество I, а соединение III — в 370 раз более прочный. Антихолинэстеразные свойства

<sup>1</sup> Антихолинэстеразную активность соединений выражают величиной  $\text{I}_{50}$ , которая соответствует молярной концентрации вещества, вызывающей угнетение холинэстеразы на 50%. Нередко вместо  $\text{I}_{50}$  используют его отрицательный логарифм  $\text{pI}_{50} (\text{pI}_{50} = -\log \text{I}_{50})$ .



соединений этого типа в очень большой степени зависели от того, в каком положении находится гидроксил в бензольном кольце. Наибольшей активностью обладало 3-оксипроизводное (II). При введении гидроксила в положение 2 или 4 антихолинэстеразная активность была значительно ниже и мало отличалась от активности исходного вещества (I). Усиление способности угнетать холинэстеразу при введении гидроксила авторы (Wilson, Quan, 1958) объясняют тем, что гидроксил (если он находится на определенном расстоянии от атома азота) образует водородную связь с активной поверхностью фермента.

Чрезвычайно близким по строению к веществу II является тензилон (эдрофоний), который получил распространение в медицинской практике в качестве антихолинэстеразного вещества. Тензилон отличается от II только тем, что одна из метильных групп II, связанных с азотом, замещена на этильную.



$I_{50}$  тензилона оказалась близкой для истинной холинэстеразы разного происхождения: эритроциты быка  $3,4 \cdot 10^{-5}$  (Smith et al., 1952), мозг крысы  $5 \cdot 10^{-5}$  М (Macfarlane et al., 1950), эритроциты человека  $4 \cdot 10^{-6}$  М (Hobbiger, 1952).

Во многих случаях введение в молекулу вещества второй четвертичной группы, т. е. создание бис-четвертичных соединений, приводило к значительному усилению антихолинэстеразной активности. На примере относительно просто построенных алифатических соединений типа  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_n\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  было показано, что с увеличением числа метиленовых групп способность угнетать холинэстеразу равномерно возрастает (Coleman, Eley, 1962). В каждом случае активность бис-четвертичного вещества была выше, чем активность соответствующего моночетвертичного. Первоначально это пытались объяснить тем, что истинная холинэстераза содержит два анионных центра и поэтому две четвертичные группы, расположенные на определенном расстоянии друг от друга, обеспечивают более прочную связь с ферментом (Bergmann, 1955). Однако Колеман и Эли (Coleman, Eley, 1962), исследовав соединения этого типа с числом метиленовых групп от 3 до 12, не нашли оптимального расстояния и пришли к выводу, что усиливающий эффект второй четвертичной группы зависит от того, что она прикрепляется к ферментному белку за счет ион-дипольного взаимодействия и этим способствует ориентации всей молекулы вещества на активной поверхности фермента. Естественно, что при таких усло-

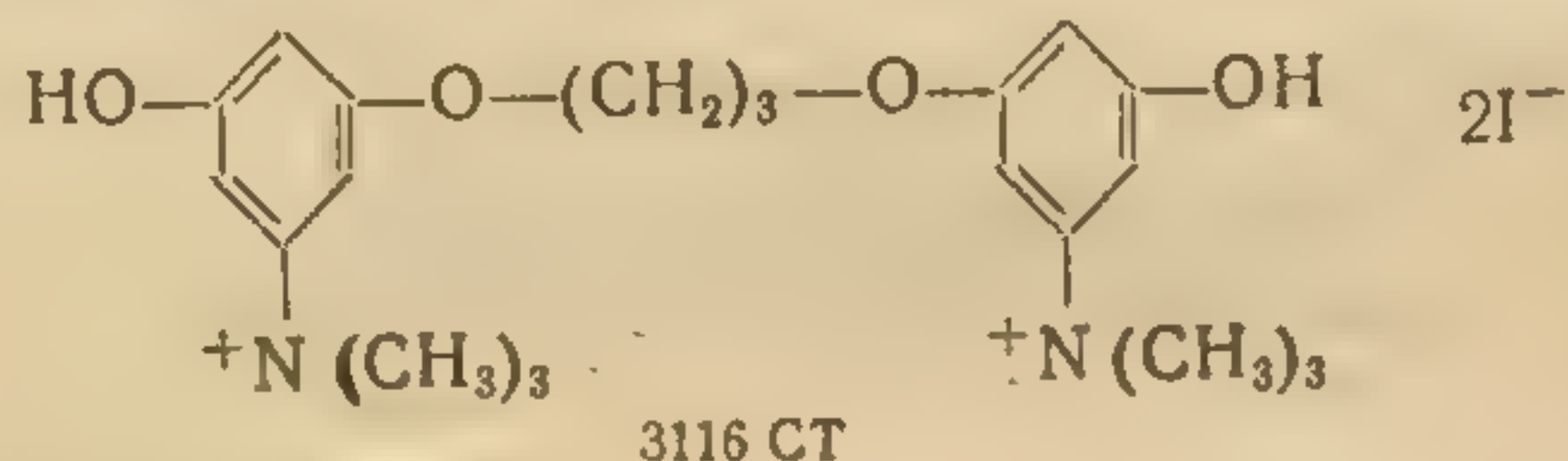


виях с увеличением длины цепи прочность комплекса возрастает соответственно увеличению количества ван-дер-ваальсовых связей. Самое активное из веществ этого ряда ( $n = 12$ ) характеризовалось величиной  $pI_{50} = 6,67$ .

Усиление антихолинэстеразных свойств при увеличении расстояния между четвертичными группами было показано также для бис-хинолиниевых (Barlow, Himms, 1955) и бис-изохинолиниевых (Smith et al., 1953) производных.

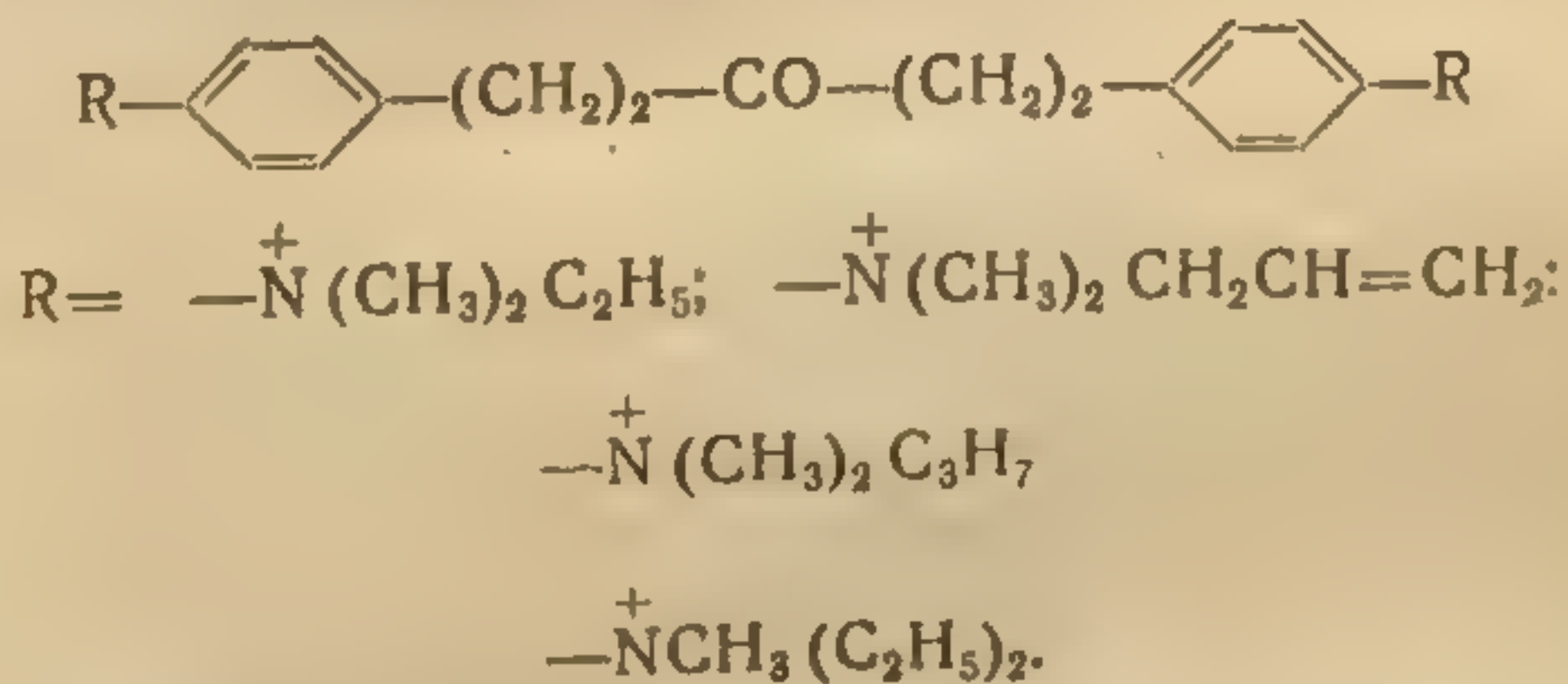
Путем дальнейшего усложнения бис-четвертичных соединений, главным образом за счет введения в их молекулу различных циклических группировок, многим исследователям удалось создать вещества с очень высокой антихолинэстеразной активностью, нередко обладающие избирательной способностью угнетать истинную холинэстеразу.

Функе и др. (Funke et al., 1954) синтезировали дифенольное производное — вещество 3116СТ, которое угнетало холинэстеразу эритроцитов на 50% в концентрации  $2 \cdot 10^{-10}$  М. Это веще-



ство отличалось чрезвычайно выраженной избирательностью действия: ложную холинэстеразу оно угнетало в 250 000 раз хуже, чем истинную (Depierre, Funke, 1954).

Активными ингибиторами холинэстеразы оказались вещества, имеющие строение:

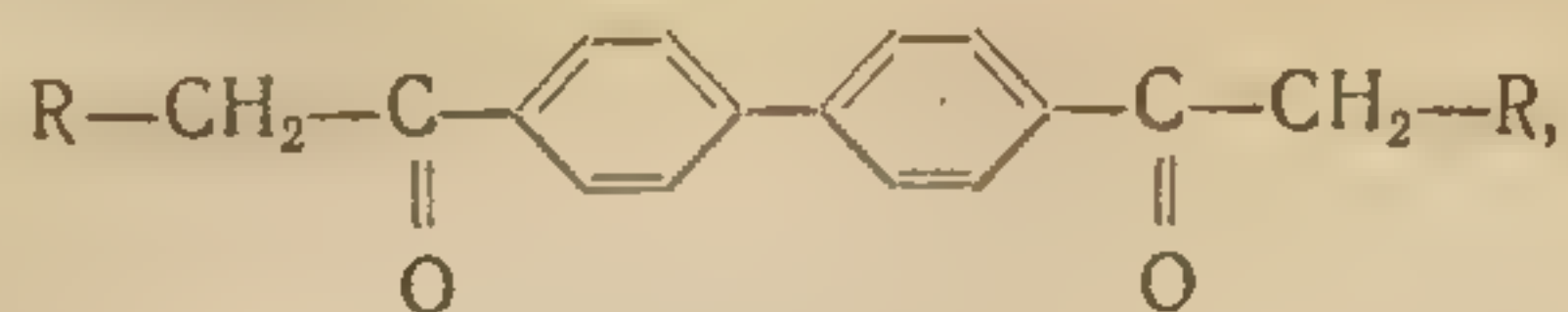


Все эти вещества характеризовались  $pI_{50} = 7,5 - 7,8$  для истинной холинэстеразы, тогда как для ложной холинэстеразы  $pI_{50}$  был меньше 3 (Fulton, Mogeу, 1954).

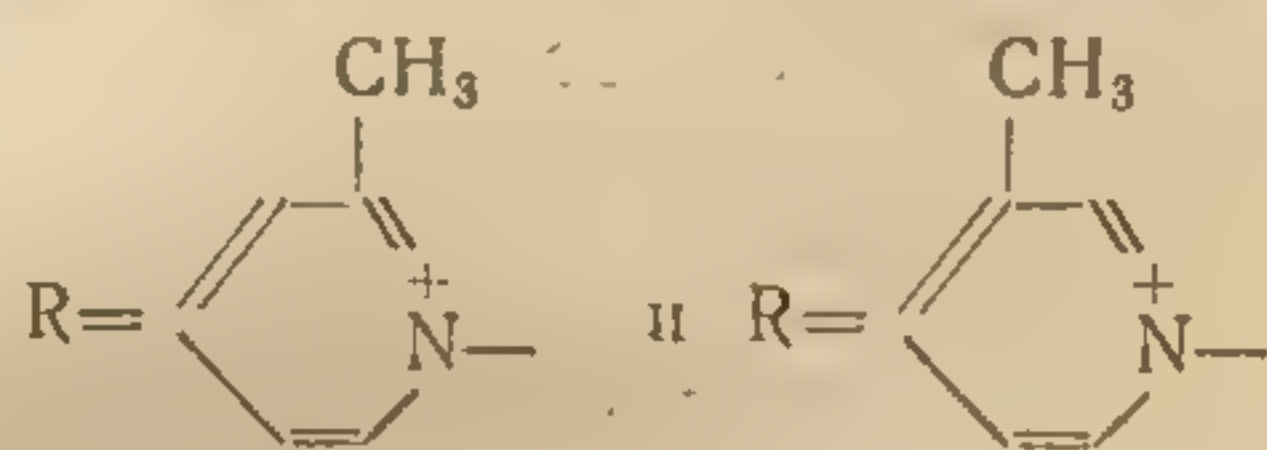
Соединение этого ряда с  $\text{R} = -\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$  под названием вещества 284 с 51 В.В. получило широкое распространение в качестве избирательного ингибитора истинной холинэстеразы (Austin, Berry, 1953; Todrick, 1954; Bayliss, Todrick, 1956).



Лонг и Шюлер (Long, Schueler, 1954) синтезировали и исследовали значительное число бис-фенилациламмониевых производных дифенила:

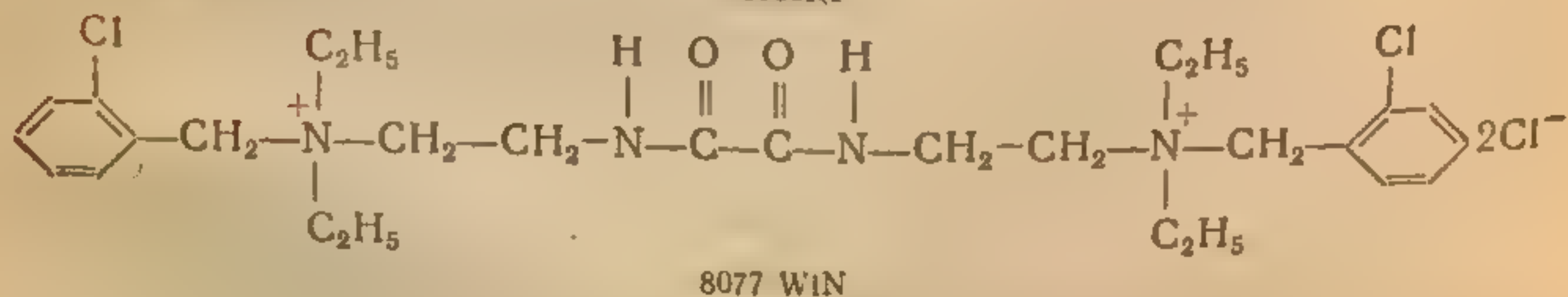
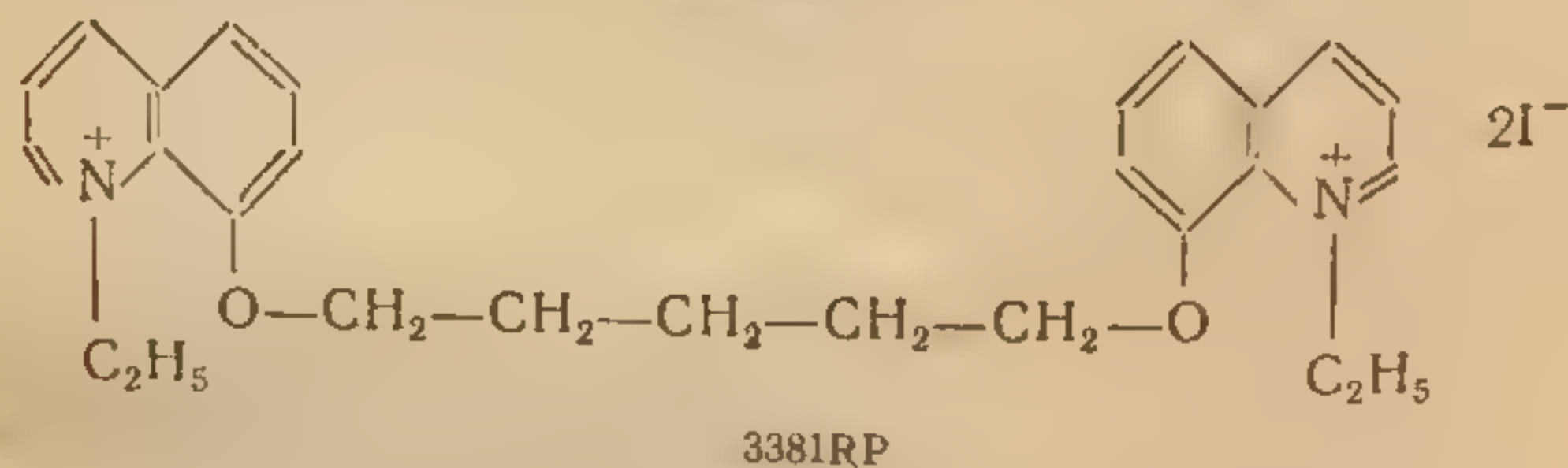
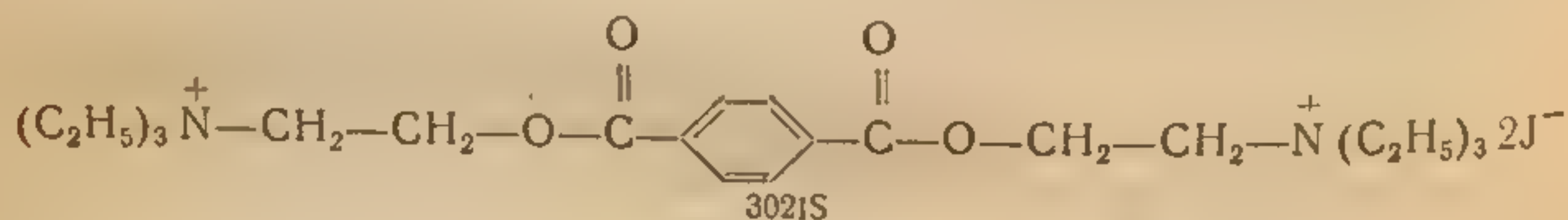


где R — различные ароматические или алифатические галогениды четвертичных аммониевых оснований. Наиболее активными ингибиторами холинэстеразы оказались вещества с



Они имели  $I_{50} = 10^{-9} - 10^{-10}$  М. Токсичность веществ не изменялась параллельно их антихолинэстеразной активности. Так, наиболее токсичным оказалось соединение с  $\text{R} = -\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  (ЛД-50 для мышей 0,02 мг/кг), которое обладало наименьшей способностью угнетать холинэстеразу.

Выраженным избирательным действием на истинную холинэстеразу обладают вещества: 302IS (Bovet-Nitti, Bovet, 1953; Holmstedt, 1957); 3381RP (Bovet et al., 1946; Holmstedt, 1959); 8077 WIN (Arnold et al., 1954; Karczmar, Howard, 1955; Lands et al., 1957) и некоторые другие. Большинство из них угнетает холинэстеразу эритроцитов на 50% в концентрации порядка  $10^{-7} - 10^{-10}$  М.

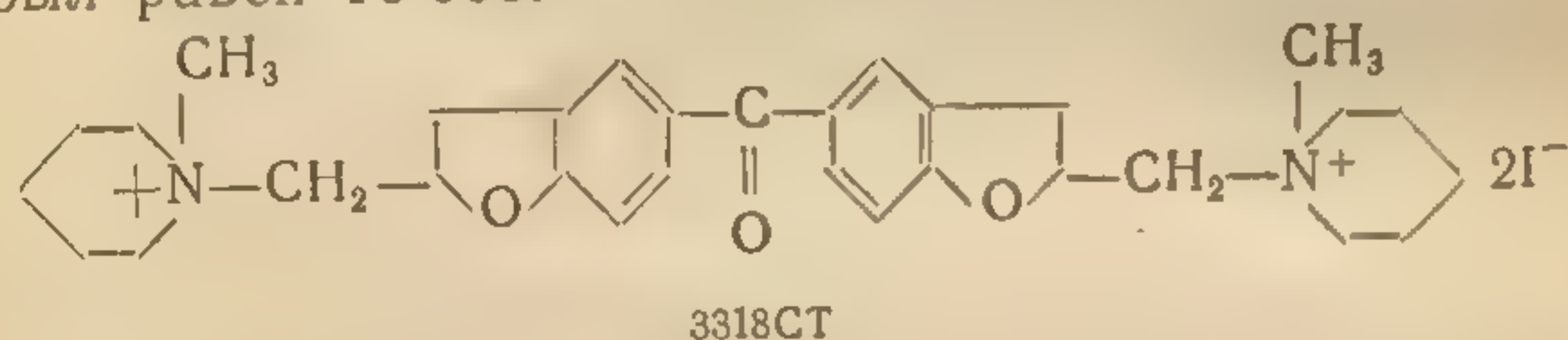


Наибольший интерес среди этих соединений представляет вещество 8077WIN (известное также под названиями амбено-

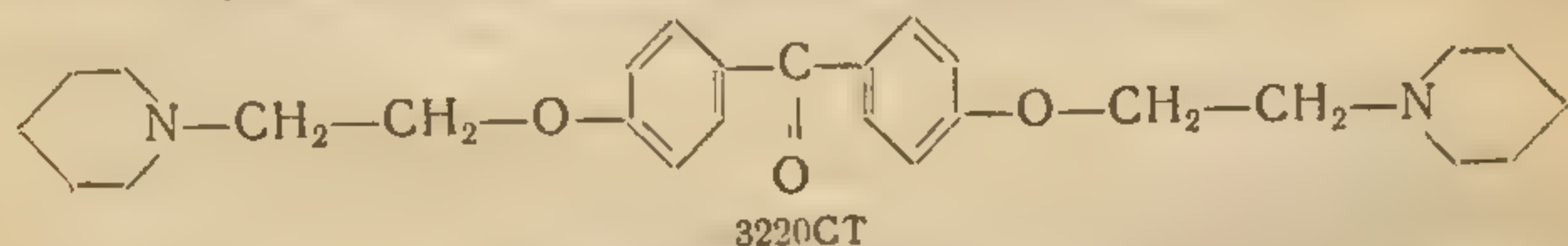


ний, мителаза, мисуран), которое в лабораторных исследованиях используется как избирательный ингибитор истинной холинэстеразы, а в клинической практике получило распространение в качестве средства для лечения миастении. Лендс и др. (Lands et al., 1958) синтезировали и исследовали большое число соединений, близких амбенонию по структуре.

Значительное число производных дифенила и дикумарина исследовали: Jacob, Funke, 1953; Jacob, 1955; Jacob, Deshavasine, 1956. Наиболее активным оказалось вещество 3318СТ. Его  $I_{50}$  для истинной холинэстеразы составляла  $1 \cdot 10^{-8}$  М, а для ложной —  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Таким образом, индекс избирательности действия был равен 10 000.

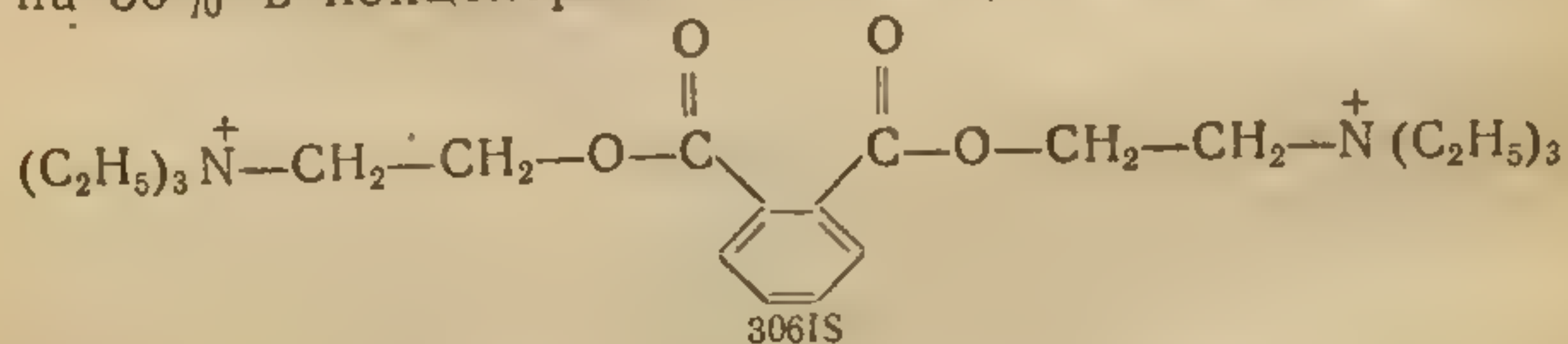


Интересно отметить, что среди соединений, изученных Жакобом, были такие, которые и в форме третичных аминов обладали выраженным антихолинэстеразным действием. К ним относится, например, вещество 3220СТ:



Оно характеризовалось  $I_{50} = 1 - 3 \cdot 10^{-7}$ , и йодметилирование не повышало его антихолинэстеразной активности. По-видимому, и в третичной форме оно в достаточной степени ионизировано при  $pH = 7,4$  (при котором производилось исследование), чтобы обеспечить пужную связь с анионным центром фермента.

Среди бис-четвертичных соединений имеются вещества, которые избирательно действуют не на истинную, а на ложную холинэстеразу. Выше упоминался избирательный ингибитор истинной холинэстеразы — вещество 302IS. Оказалось, что его орто-изомер (вещество 306IS), который можно рассматривать как производное фталевой кислоты, практически совершенно не влияет на истинную холинэстеразу, но угнетает ложный фермент на 50% в концентрации  $10^{-5}$  М (Bovet-Nitti, Bovet, 1953).



Барстад и др. (Barstad et al., 1959) исследовали ряд более сложных бис-четвертичных производных фталевой кислоты и по-



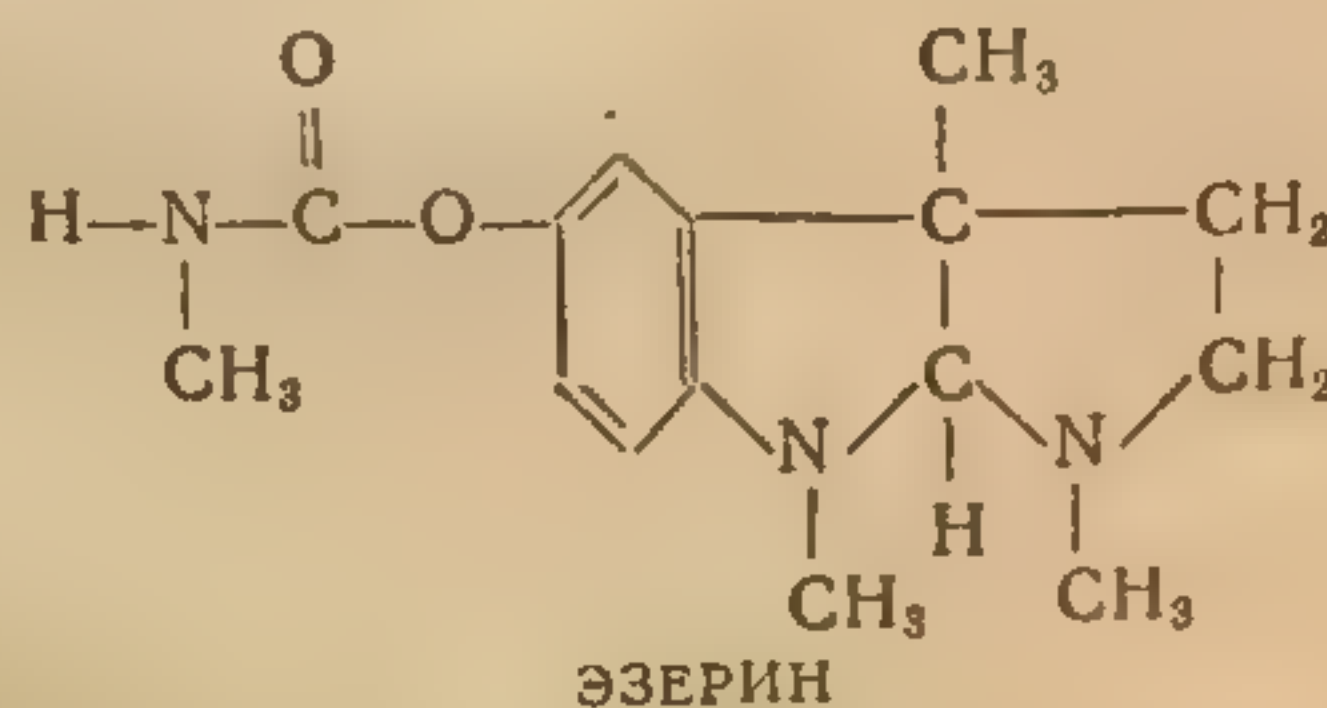
казали, что все они являются избирательными ингибиторами ложной холинэстеразы.

Угнетение холинэстеразы четвертичными соединениями, как правило, легко обратимо. Достаточно, например, подвергнуть угнетенный фермент диализу или отмыть эритроциты путем повторного центрифугирования с физиологическим раствором, чтобы активность холинэстеразы быстро и полностью восстановилась до исходного уровня. Правда, в некоторых случаях (например, вещество 3116СТ и близкое к нему по строению 3443СТ) образуется более прочный комплекс между ингибитором и ферментом и простое отмывание эритроцитов не восстанавливает активность фермента; но после гемолиза и разведения в 12 раз восстановление происходит очень быстро (Tazieff-Depierre, Martin, 1962).

Угнетение холинэстеразы четвертичными соединениями всегда носит выраженный конкурентный характер, однако тщательные кинетические исследования, выполненные в последнее время (Wilson, Alexander, 1962), показали, что даже в действии таких просто построенных соединений, как триметиламмоний, тетраметиламмоний, фенилтриметиламмоний, N-метилпиридиний и др., можно выявить неконкурентный компонент. Это объясняется тем, что перечисленные соединения тормозят активность холинэстеразы не только путем взаимодействия со свободным ферментом (где конкурентные отношения с ацетилхолином выражены в полной мере), но и благодаря реакции с ацетилированным ферментом (торможение деацетилирования), которая носит неконкурентный характер. Этот же механизм лежит в основе торможения холинэстеразы избытком ацетилхолина (см. стр. 56).

#### ЭФИРЫ КАРБАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

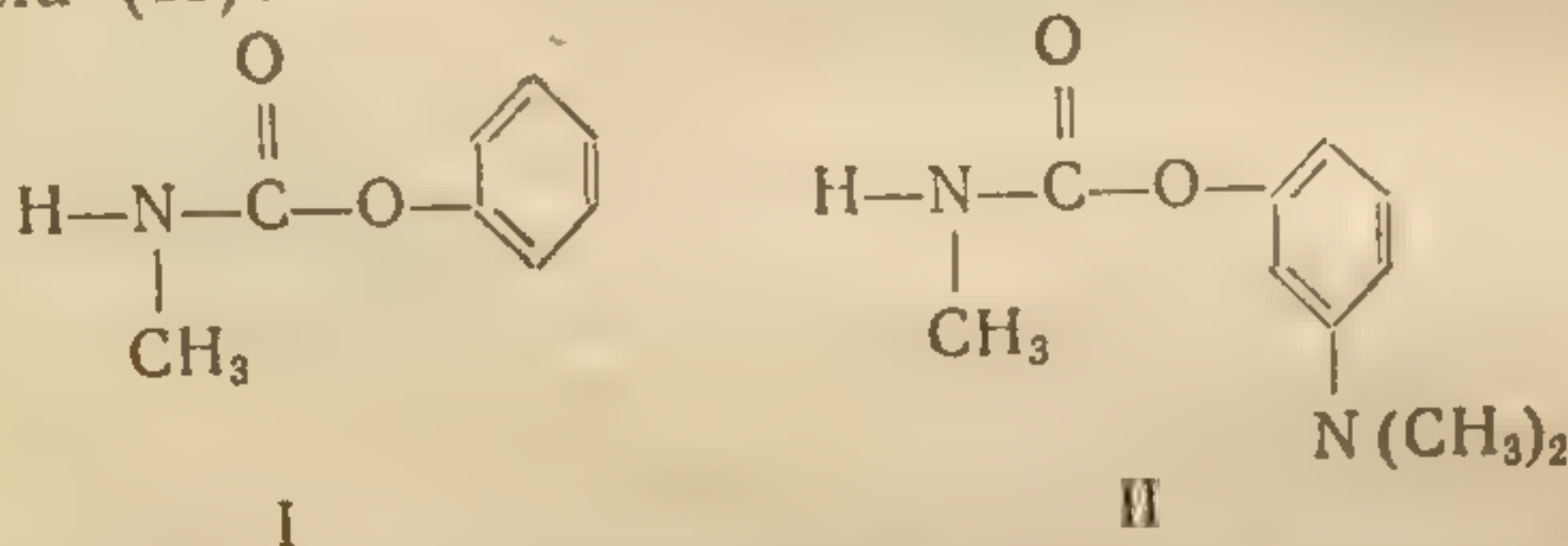
Первым антихолинэстеразным веществом, открытым вместе с холинэстеразой (Loewi, Navratil, 1926; Engelhardt, Loewi, 1930), был эзерин (физостигмин) — алкалоид из калабарских бобов, еще в прошлом столетии вошедший в медицинскую практику в качестве миотика.



Эзерин представляет собой полициклическое соединение, которое можно рассматривать как монометилкарбаминный эфир

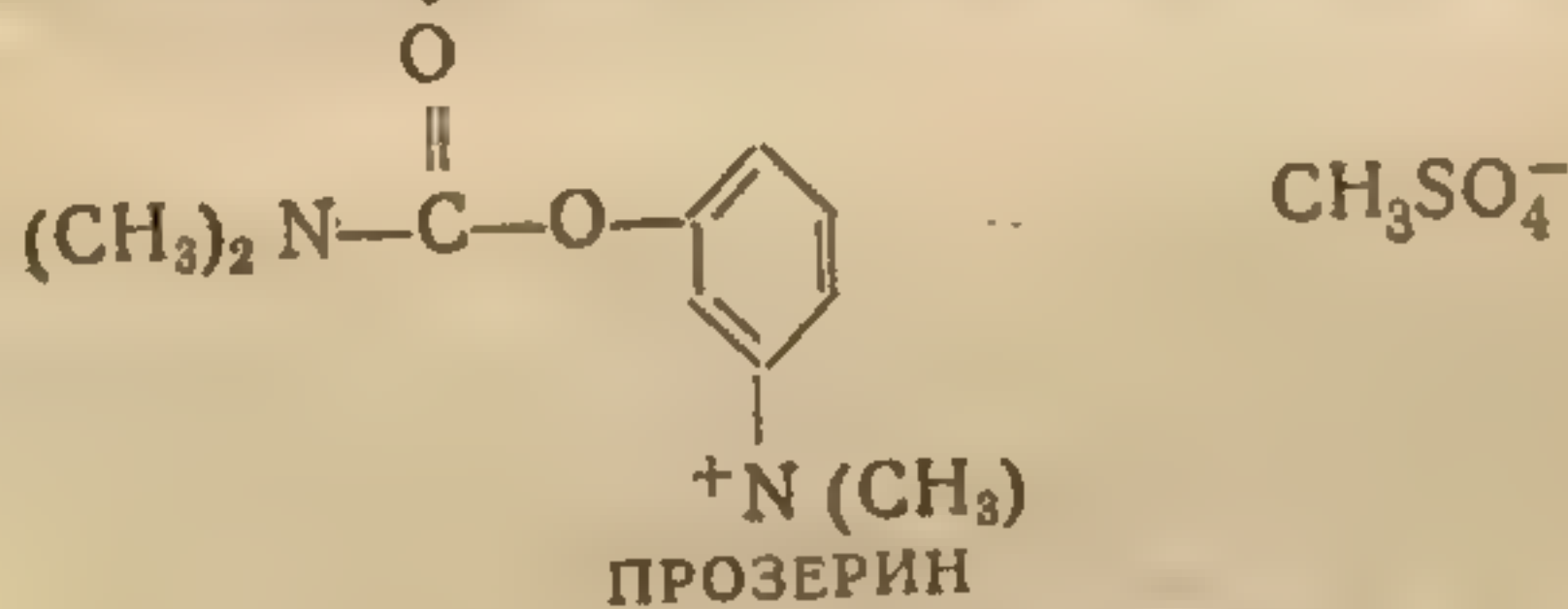


замещенного фенола. Вскоре после обнаружения антихолинэстеразных свойств эзерина было синтезировано и изучено большое число соединений с целью выяснить, какой химической группировке обязан эзерин своей способностью угнетать холинэстеразу (Stedman, Stedman, 1926, 1929; Aeschlimann, Reinert, 1931). В результате оказалось, что определяющую роль играет карбаминная группа, так как соответствующие фенолы, получающиеся при гидролизе карбаминных эфиров, были лишены антихолинэстеразных свойств. В то же время метилкарбаминный эфир фенола (I) тоже не обладал антихолинэстеразным действием. Это действие появлялось при введении в молекулу аминогруппы, например у метилкарбаминного эфира-м-диметиламинофенола (II):

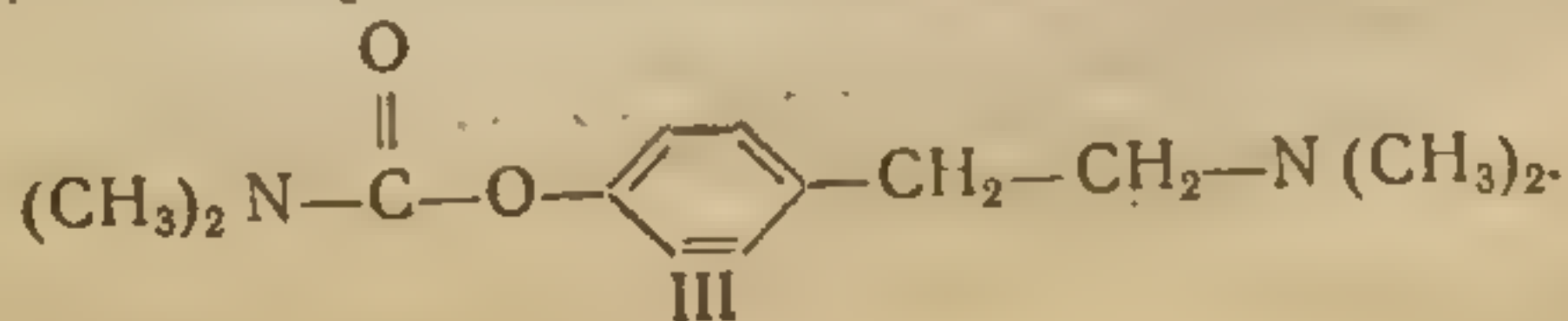


Перевод третичной аминогруппы в четвертичную аммониевую группу еще больше усиливал антихолинэстеразную активность. Из изученных соединений этого типа наиболее эффективным ингибитором холинэстеразы оказался прозерин (простигмин, неостигмин), который представляет собой метилсульфометилат II.

Интересно отметить, что кватернизация усиливала антихолинэстеразные свойства вещества только в том случае, если атом азота находился в самом кольце, либо был непосредственно присоединен к кольцу, как в молекуле прозерина:

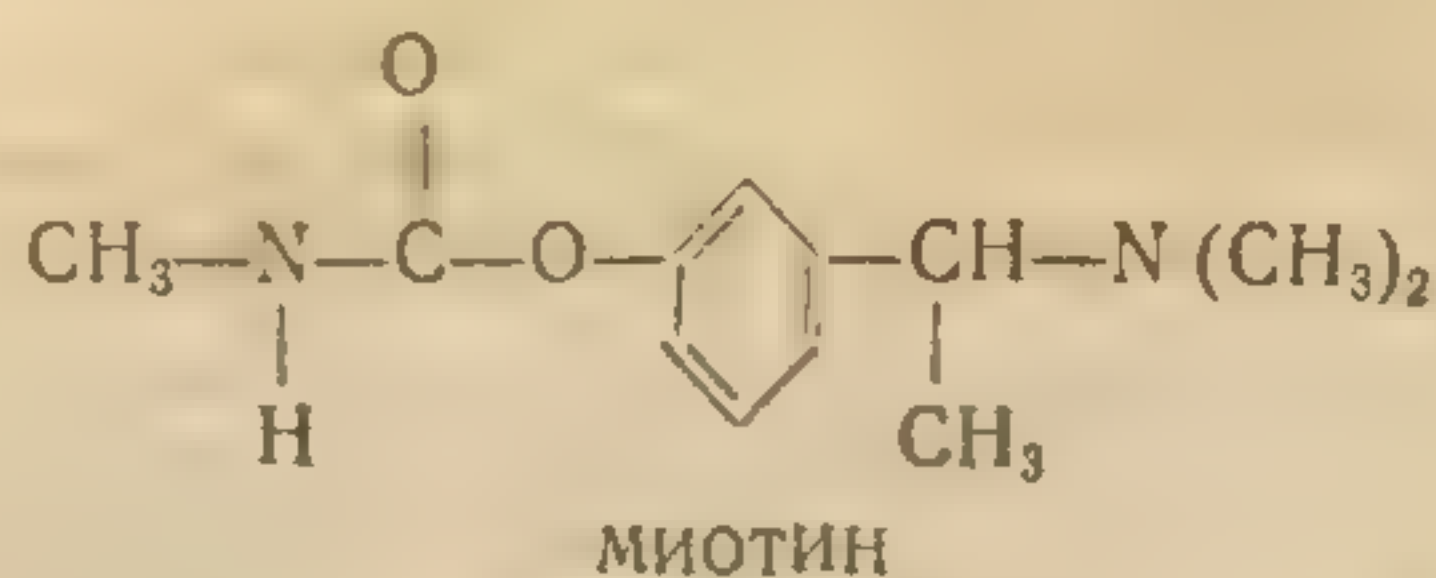


Если же азот находился в боковой цепи на некотором расстоянии от кольца, то перевод в четвертичную аммониевую соль приводил к ослаблению антихолинэстеразного действия. Так, третичный амин — п-(β-диметиламиноэтил)-фениловый эфир диметилкарбаминной кислоты (III) был более активным, чем соответствующее четвертичное соединение:

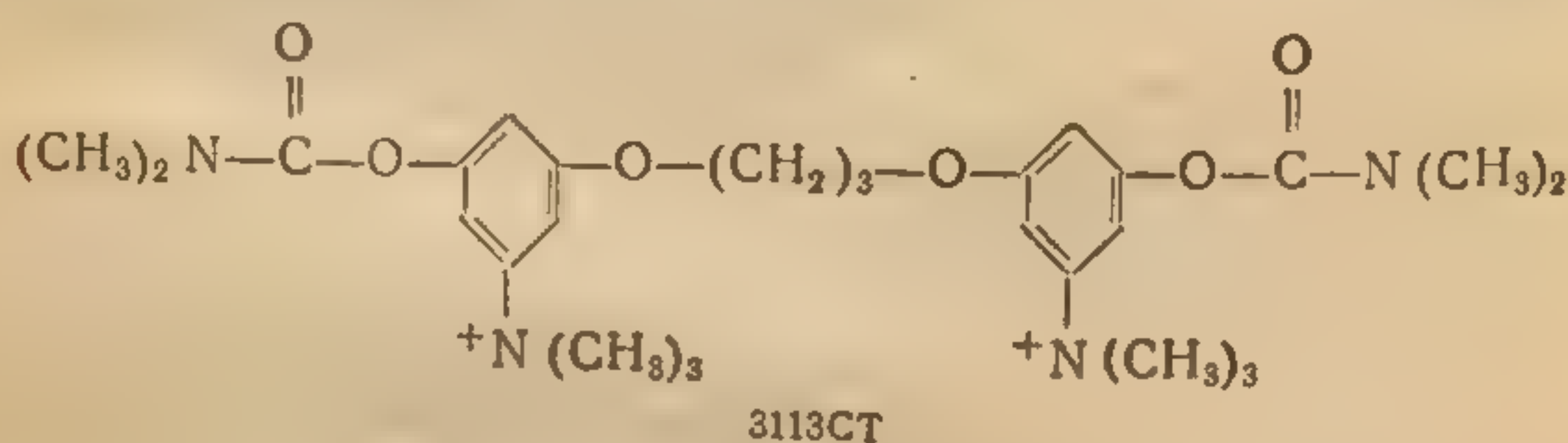




Активным ингибитором холинэстеразы является и другой третичный амин—миотин:



Фолдс и др. (Foldes et al., 1958) исследовали большую группу производных прозерина, отличающихся друг от друга различным расстоянием между четвертичным азотом и карбонильной группой (C=O). Наиболее активными оказались вещества, у которых это расстояние составляло 4,7 Å, т. е. было таким же, как в молекуле натурального субстрата холинэстеразы — ацетилхолина. Интересную попытку создания высокоактивных антихолинэстеразных веществ предпринял Функе. Для этой цели он ввел диметилкарбаминовые группы в синтезированные им бис-четвертичные соединения, которые и без того обладали высоким антихолинэстеразным действием. Таким путем на основе вещества 3116СТ (см. формулу, стр. 73) были получены соединения с одной (3152СТ) или с двумя (3113СТ) карбаминовыми группами:

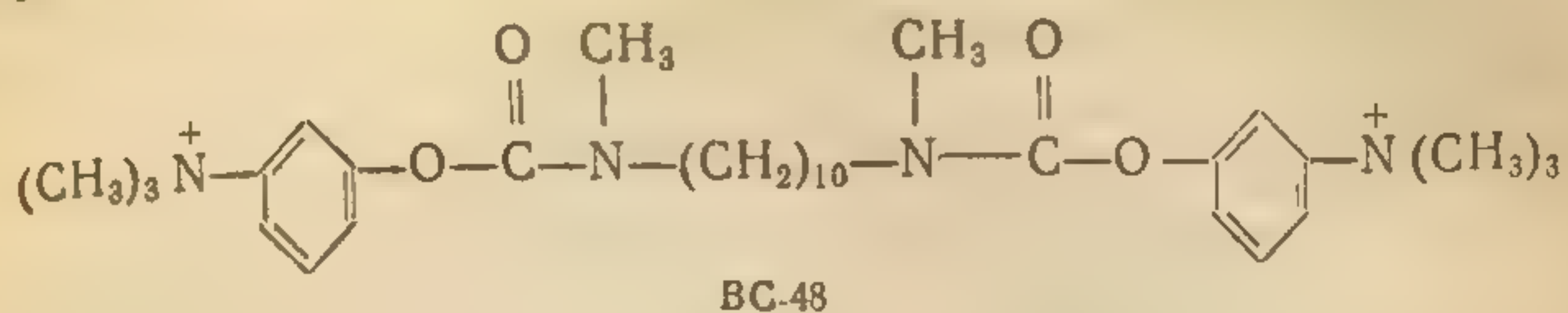


Первоначально Функе и др. (Funke et al., 1952) сообщили, что эти вещества обладали феноменально высокой антихолинэстеразной активностью: 50%-ное угнетение в концентрации  $10^{-14}$  —  $10^{-16}$  М, однако при последующей проверке сами авторы (Depierre, Funke, 1954) и другие исследователи (Levin, Japodorf, 1955) показали, что это не соответствует действительности:  $I_{50}$  этих веществ была равна  $10^{-9}$  —  $10^{-10}$  М и резкое (в несколько десятков тысяч раз) повышение антихолинэстеразного действия относилось только к ложной холинэстеразе. Таким образом, введение карбаминовых групп в соединения этого типа в значительной степени снижало избирательность их действия на истинную холинэстеразу.

Другим примером высокоэффективных антихолинэстеразных веществ, имеющих бис-четвертичное строение и содержащих карбаматные группы, могут служить соединения типа ВС

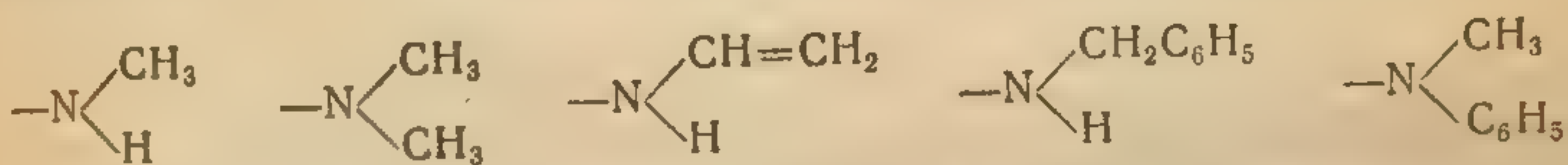


(Kraup et al., 1955a, б; Klupp et al., 1955; Stumpf, 1959). Их характерным представителем является вещество ВС-48:



В веществах этого типа антихолинэстеразная эффективность возрастала с увеличением числа метиленовых групп. У соединений с одинаковой длиной полиметиленовой цепочки замена метильной группы при карбаматном азоте на водород снижала антихолинэстеразное действие. Аналогично построенные вещества, но не содержащие циклических групп в своей молекуле, обладали менее выраженной способностью угнетать холинэстеразу (Klupp et al., 1953).

Антихолинэстеразная активность в большой мере зависит от строения карбаминовой группы. Эшлиман и Рейнерт (Aeschlimann, Reinert, 1931) показали, что наиболее выраженными ингибиторами холинэстеразы являются карбаминовые эфиры аминифенолов со следующими заместителями при карбаматном азоте:



Эфиры незамещенной карбаминовой кислоты обладают сравнительно слабым антихолинэстеразным действием.

Как правило, монометилкарбаматы сильнее угнетали холинэстеразу, чем диметилкарбаматы. Это различие в последнее время особенно четко было показано на примере моно- и диметилкарбамилхолина, а также неостигмина и его монометилкарбамильного аналога (Wilson et al., 1961).

Ниже приводится табл. 9, иллюстрирующая антихолинэстеразную активность различных эфиров карбаминовой кислоты. Соединения в таблице расположены в порядке убывания их способности подавлять активность истинной холинэстеразы.

Из таблицы видно, что в большинстве случаев карбаматы приблизительно в одинаковой степени угнетают активность истинной и ложной холинэстеразы, однако среди них встречаются и соединения с более или менее выраженной избирательностью действия. К числу избирательных ингибиторов истинной холинэстеразы можно отнести вещество ВС-48 и, особенно, Nu-1250, которое угнетает истинную холинэстеразу в 20 000 раз эффективнее, чем ложную. Правда, нужно отметить, что избирательность действия Nu-1250 в большой степени зависит от происхождения фермента. Приведенные в таблице данные относятся к



Таблица 9

Антихолинэстеразная активность некоторых эфиров карбаминовой кислоты

Соединение	pI <sub>50</sub>		Автор
	для истинной холинэстеразы	для ложной холинэстеразы	
BC-48 (формула на стр. 79)	10,0	8,2	Kraup et al., 19556
3113CT (формула на стр. 78)	9,0	8,3	Depierre, Funke, 1954
$\text{CH}_3-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	8,7		Wilson et al., 1961
$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ Nu 1250	8,3	4,0	Hawkins, Mendel, 1949
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	8,2	8,0	Blaschko et al., 1949
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$	8,0	7,3	Blaschko et al., 1949
Прозерин (формула на стр. 77)	7,4	7,2	Blaschko et al., 1949
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	7,2	7,4	Blaschko et al., 1949
Миотин (формула на стр. 78)	7,2	6,4	Blaschko et al., 1949
Эзерин (формула на стр. 76)	7,1	7,7	Blaschko et al., 1949



Соединение	pI <sub>50</sub>		Автор
	для истинной холин-эстеразы	для ложной холин-эстеразы	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}-\text{O} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+\text{CH}_3 \end{array}$	7,1	7,6	Blaschko et al., 1949
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}-\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">Nu 1197</p>	6,9	7,1	Blaschko et al., 1949
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}-\text{O} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+\text{CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">ПИРИДОСТИГМИН</p>	6,4	5,8	Blaschko et al., 1949
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p style="text-align: center;">Nu 683</p>	6,05	8,5	Foldes et al., 1958
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{N}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\   \\ \text{H} \end{array}$ <p style="text-align: center;">МЕТИЛКАРБАМИЛХОЛИН</p>	4,8		Wilson et al., 1961
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}-\text{F} \\   \\ \text{O} \end{array}$ <p style="text-align: center;">ДИМЕТИЛКАРБАМИЛФТОРИД</p>	4,8		Wilson et al., 1961
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">ДИМЕТИЛКАРБАМИЛХОЛИН</p>	4,1		Wilson et al., 1961



ферменту эритроцитов и плазмы человека, но те же авторы (Hawkins, Mendel, 1949) показали, что холинэстераза сыворотки лошади лишь в 5 раз более чувствительна к Nu-1250, чем фермент эритроцитов лошади.

Выраженным избирательным ингибитором ложной холинэстеразы оказалось вещество Nu-683, которое угнетало фермент сыворотки в 300 раз активнее, чем фермент эритроцитов.

#### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАРБАМАТОВ НА ХОЛИНЭСТЕРАЗУ

Еще в 1949 г. Аугустинссон и Нахманзон (Augustinsson, Nachmansohn) отметили, что эзерин и прозерин сравнительно медленно «вступают в равновесие» с холинэстеразой. Уже это одно свидетельствует о том, что данные вещества не просто образуют с ферментом обратимый комплекс, а реагируют с ним более сложно. На протяжении последующих лет механизм антихолинэстеразного действия производных карбаминовой кислоты не подвергался детальному экспериментальному исследованию, однако неоднократно высказывались предположения, что вещества этого типа реагируют с холинэстеразой подобно необратимым фосфорорганическим ингибиторам (Myers, Kemp, 1954; Augustinsson et al., 1959). В 1960 г. (Wilson, Hatch, Ginsburg, 1960) эта точка зрения получила экспериментальное подтверждение. Было установлено, что обработка холинэстеразы карбамилхолином, диметилкарбамилхолином и диметилкарбамилфторидом приводит к образованию карбамилированного производного холинэстеразы. Эти вещества медленно угнетали фермент, и после разведения холинэстераза медленно восстанавливала свою активность. Продолжая эти исследования, Вильсон и др. (Wilson et al., 1961) провели тщательное изучение кинетики угнетения холинэстеразы карбатами различного строения и при этом выявили чрезвычайно интересный факт: скорость восстановления активности холинэстеразы после многократного разведения смеси ингибитора с ферментом зависела только от строения карбамильной части молекулы ингибитора. Так, для всех производных диметилкарбаминовой кислоты (диметилкарбамилхолин, диметилкарбамилфторид, прозерин, пиридостигмин) независимо от их строения и от их антихолинэстеразной активности время, в течение которого активность фермента восстанавливалась наполовину, составляло 25—27 мин. Точно так же для совершенно различно построенных производных метилкарбаминовой кислоты (эзерин и метилкарбамилхолин) время полувосстановления тоже было одинаковым и составляло 37—39 мин. Как видим, оно существенно отличалось от величины, полученной для диметилкарбаматов.

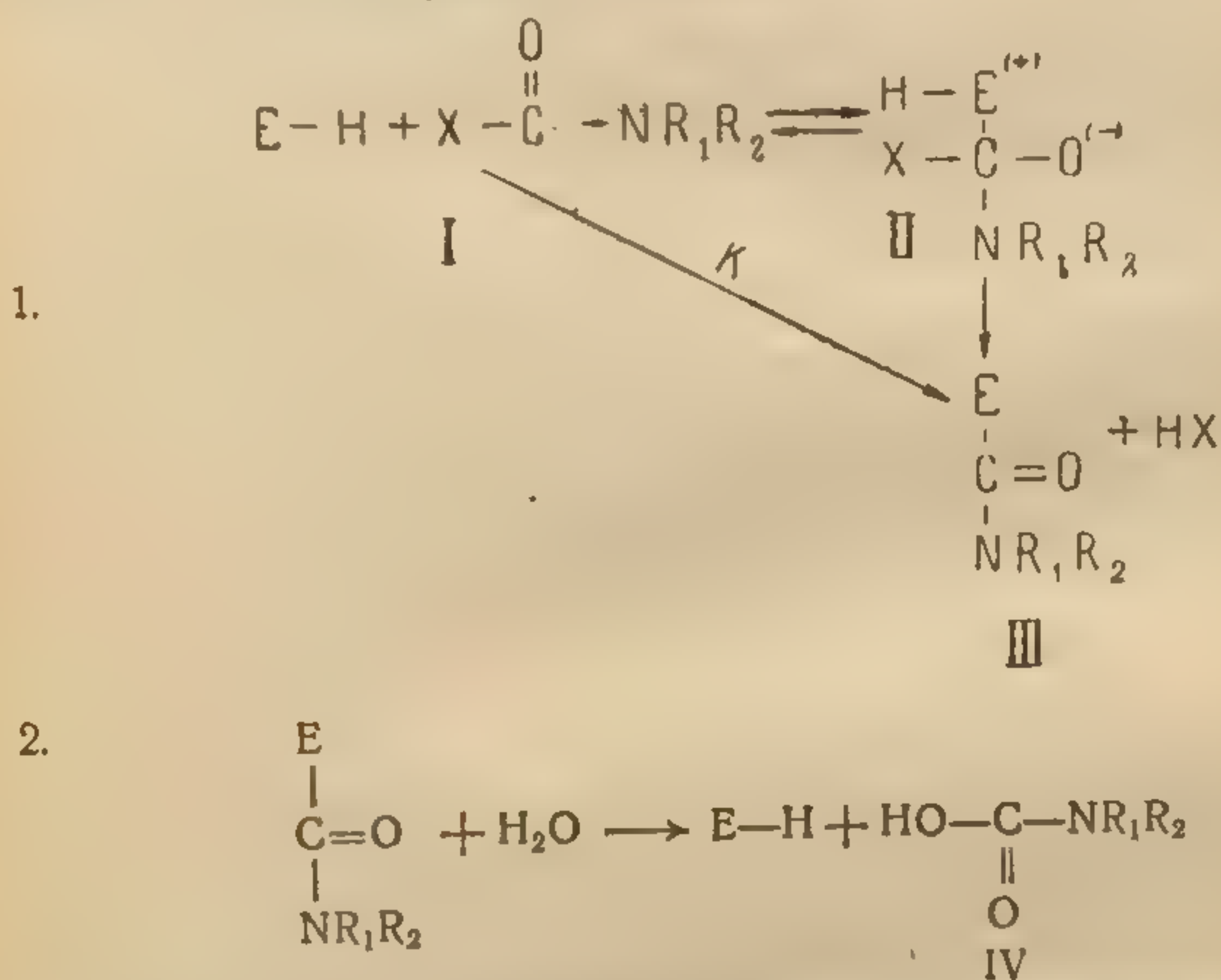
Значительно более медленно происходило восстановление активности после обработки холинэстеразы некоторыми бис-



четвертичными карбаматами — например, соединениями типа ВС (см. формулу, стр. 79). Так, для ВС-47 время полувосстановления составляло 1400 мин, а для ВС-48 — 2300 мин. Здесь вообще уже трудно говорить об обратимости действия, так как известно, что после угнетения некоторыми фосфорорганическими ингибиторами спонтанная реактивация холинэстеразы происходит быстрее.

В этих же исследованиях было установлено, что гидроксил-амин значительно ускоряет восстановление активности после угнетения холинэстеразы карбаматами различного строения.

Единственное объяснение приведенных фактов может состоять в том, что в ходе реакции между карбаматами и холинэстеразой остаток карбаминовой кислоты присоединяется к ферменту, тем самым инактивируя его, а образовавшееся в результате этого карбамилпроизводное холинэстеразы при разведении постепенно гидролизуется, распадаясь на карбаминовую кислоту и активный фермент. Весь процесс может быть представлен в виде следующей схемы:



Здесь E—H — активный фермент; I — ингибитор, содержащий карбаматную группу; II — обратимый комплекс фермент—ингибитор; III — карбамилированный фермент; HX — отщепившийся остаток ингибитора; IV — карбаминовая кислота. На схеме ясно видно, что структура карбамилированного фермента определяется только строением карбамильной части молекулы ингибитора, и поэтому скорость восстановления холинэстеразы после разведения, которая определяется скоростью гидролиза карбамилированного фермента, будет одинаковой для самых различных ингибиторов, если только они имеют одинаковую

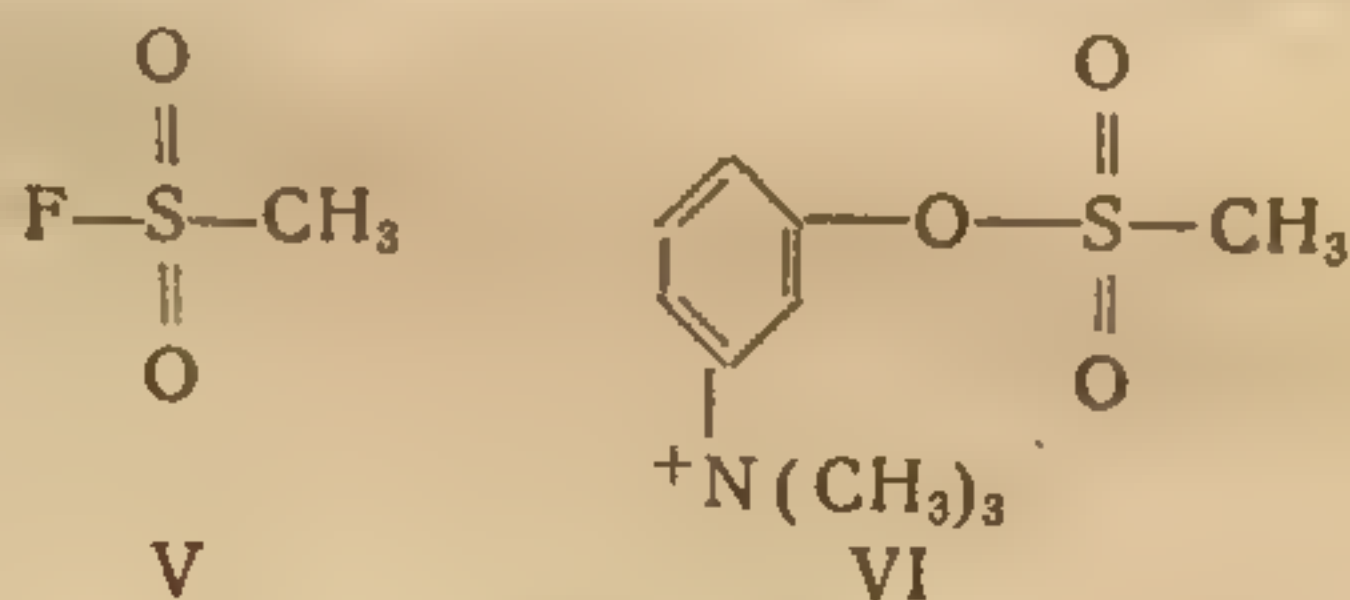


карбамильную часть. Схема хорошо объясняет и реактивирующий эффект гидроксиламина, который является значительно более сильным нуклеофильным реагентом, чем вода, и поэтому быстрее реагирует с карбамилированным ферментом.

На схеме видно, что на первом этапе образуется обратимый комплекс фермент — ингибитор (II), однако концентрация этого комплекса в каждый данный момент реакции, по-видимому, очень не велика, так как он очень быстро превращается в карбамилированный фермент. Скорость этого превращения непосредственно измерить не удалось, но Вильсон и др. (Wilson et al., 1961) определили константу скорости  $k$  бимолекулярной реакции, отражающей суммарный процесс карбамилирования холинэстеразы. Эта величина оказалась очень большой: для эзерина она составляла  $2 \cdot 10^6$  л/моль·мин, для прозерина —  $9,5 \cdot 10^5$ , для пиридостигмина —  $1,6 \cdot 10^4$ .

Карбамилирование холинэстеразы может быть предотвращено, если перед добавлением карбамата обработать фермент каким-нибудь соединением, способным образовывать с ним комплекс. Депьер и Мартин (Depierre, Martin, 1958) показали, что многие четвертичные и бис-четвертичные аммониевые ингибиторы холинэстеразы защищают фермент от последующего инактивирования прозеринном. При этом была установлена хорошая корреляция между защитным и антихолинэстеразным действием соединений.

В последнее время (Kitz, Wilson, 1962) было показано, что подобно карбаматам с холинэстеразой реагируют и производные метансульфокислоты — например, метансульфонилфторид (V), метансульфонат 3-оксифенилтриметиламмония (VI) и др.



При взаимодействии с холинэстеразой они образовывали метансульфонил-фермент по следующей схеме:



Метансульфонил-фермент, в отличие от карбамил-фермента, получающегося при реакции с карбаматами, оказался чрезвычайно стойким соединением и не разрушался ни под действием воды, ни под влиянием многих других нуклеофильных реагентов. Благодаря этому угнетение холинэстеразы эфирами метансульфокислоты было практически необратимым. Лишь в особых условиях (100-кратное разведение и последующая обработка йодметилатом фенил-3-пиридил-анти-кетоксима в сравни-



тельно высокой концентрации) наблюдалось очень медленное восстановление активности метансульфонилированной холинэстеразы (Alexander et al., 1963).

Сравнение антиферментной активности различных сульфонилфторидов типа  $\text{RSO}_2\text{F}$  показало, что большинство изученных соединений угнетало трипсин и химотрипсин значительно быстрее, чем холинэстеразу. Только метансульфонилфторид действовал на холинэстеразу сильнее, чем на протеолитические ферменты. Однако и он по отношению к холинэстеразе оказался в 100 раз более слабым ингибитором, чем стандартное фосфорорганическое соединение — диизопропилфторфосфат (Fahrney, Gold, 19636).

### ДРУГИЕ ИНГИБИТОРЫ

Для полноты картины необходимо упомянуть и о других ингибиторах холинэстеразы, которые, как и вышеописанные, чаще всего вызывают обратимое угнетение фермента. Среди разных классов органических соединений известно большое число таких веществ.

Изложение всех имеющихся в литературе данных об этих веществах не представляет интереса, так как в большинстве случаев они проявляют антихолинэстеразное действие в сравнительно высоких концентрациях и это действие не может быть положено в основу их биологической активности.

В данном разделе будут упомянуты лишь те соединения, которые представляют определенный фармакологический интерес и в то же время обладают способностью выраженно угнетать активность холинэстеразы. Значительным антихолинэстеразным действием обладает психотропное вещество — диэтиламид D-лизергиновой кислоты (LSD-25) и многие его производные — например, диэтиламиды L-лизергиновой, D-изолизергиновой, 2-бром-D-лизергиновой и D-1-метиллизергиновой кислот, а также моноэтиламид и диметиламид D-лизергиновой кислоты и морфолин-D-лизергиновая кислота (Zsigmond et al., 1961). Почти все перечисленные соединения (кроме диэтиламида D-1-метиллизергиновой кислоты) угнетали ложную холинэстеразу гораздо сильнее, чем истинную. Никакой связи между психотропной активностью этих веществ и их способностью угнетать холинэстеразу не было обнаружено.

Данные о силе антихолинэстеразного действия LSD-25 противоречивы. По свидетельству Лассло и др. (Lasslo et al., 1960), это вещество тормозит холинэстеразу человеческой сыворотки на 50% в концентрации  $3,4 \cdot 10^{-7}$  М. В то же время Фрид и Антопол (Fried, Antopol, 1957) на таком же препарате холинэстеразы показали, что 50%-ное угнетение достигается только при концентрации LSD-25 около  $1 \cdot 10^{-6}$  М, а в низких концентра-



циях это соединение даже активирует фермент; так, в концентрации  $4,7 \cdot 10^{-9}$  М оно повышало активность холинэстеразы на 45%.

Выраженной способностью угнетать холинэстеразу обладает также серотонин (Lasslo, 1961; Fried, Antopol, 1957; Furnica, Furnica, 1961). По мнению некоторых исследователей (Aprison, 1962), именно эта способность лежит в основе механизма его биологического действия.

Многими авторами показано антихолинэстеразное действие производных фенотиазина, применяемых в качестве психотропных веществ. К ним относятся хлорпромазин (аминазин), промазин, сецерган, тиопропазат, дипаркол, фенерган, мультерган и др. (Hofstee, 1960; Usdin et al., 1961). Торможение истинной холинэстеразы этими веществами протекало по смешанному типу, а торможение ложной холинэстеразы было главным образом конкурентным (Usdin, 1961). Антихолинэстеразная активность хлорпромазина не очень высока: его  $I_{50}$  для холинэстеразы мозга крыс составляет  $1,1 \cdot 10^{-4}$  М (Johannesson, Lausen, 1961), а для холинэстеразы человеческой сыворотки  $5 \cdot 10^{-5}$  М (Fried, Antopol, 1957), тем не менее, некоторые авторы (Johannesson, Lawsen, 1961) именно этим свойством хлорпромазина пытаются объяснить «парадоксальное», возбуждающее действие, которое как побочный эффект иногда наблюдается при его терапевтическом применении. Способность хлорпромазина подавлять как ложную, так и истинную холинэстеразу мозга была подтверждена гистохимическими исследованиями (Wegmann et al., 1960).

Некоторые производные акридина — вещества, близкого по строению к фенотиазину, тоже обладают способностью угнетать холинэстеразу. В последнее время было показано, что выраженным антихолинэстеразным действием характеризуется такрин (1, 2, 3, 4-тетрагидро-5-аминоакридин) — вещество, которое *in vivo* пролонгировало действие мышечного релаксанта суццинилхолина.  $pI_{50}$  такрина для истинной холинэстеразы составлял 6,2, а для ложной — 7,6 (Heilbronn, 1961).

В опытах *in vitro* было показано, что ложная холинэстераза мозга отчетливо тормозится под действием тофранила (Luzzatto, Ramelli, 1962).

Выраженным антихолинэстеразным действием обладают некоторые алкалоиды различного строения. Так, магнолин угнетает истинную холинэстеразу на 50% в концентрации около  $5 \cdot 10^{-6}$  М. На ложную холинэстеразу он действует несколько слабее:  $I_{50} = 2,5 \cdot 10^{-4}$  (М. А. Толстая и М. Д. Машковский, 1950; М. Д. Машковский и др., 1950). Алкалоид подснежника — галантамин (нивалин) — получил практическое применение в качестве антихолинэстеразного вещества (М. Д. Машковский, 1955; М. Д. Машковский и Р. П. Кругликова-Львова, 1961;



Н. А. Шенк и др., 1956; В. С. Лобзин, 1960). Сравнительное исследование антихолинэстеразного действия различных производных галантамина показало, что йодметиловое галантамина несколько повышает (приблизительно в 4 раза) его способность угнетать холинэстеразу. Йодметилат имел  $I_{50} = 7 \cdot 10^{-5}$  М для ложной холинэстеразы и  $7 \cdot 10^{-6}$  М для истинной холинэстеразы. Другие изученные производные (галантамин, апогалантамин и ликорамина) действовали значительно слабее (Boissier, Lesbros, 1962).

Еще более эффективным ингибитором ложной холинэстеразы оказалась смесь алкалоидов, полученных из самшита ( $I_{50} = 2 \cdot 10^{-6}$  М). Истинная холинэстераза была значительно более устойчивой к этим алкалоидам ( $I_{50} = 2,5 \cdot 10^{-4}$  М) (Vincent, Parant, 1954).

Значительно менее выраженным антихолинэстеразным действием ( $I_{50} = 10^{-3} - 10^{-4}$  М) обладают тиамин (витамин  $B_1$ ) и его пирофосфат (De, 1955; Gjone, Skramstad, 1955); азотистые иприты, применяемые в настоящее время в качестве противоопухолевых средств (Bain, 1950; Bullock, 1955, 1956); фенадон, лидол, морфин (М. Д. Машковский и М. А. Толстая, 1950); метадон (Eadie et al., 1948;) витамин Е (Meer et al., 1951); стрихнин, никотин (Bain, 1950) и другие вещества. Нет никаких указаний на то, что биологические эффекты этих веществ связаны с их способностью угнетать холинэстеразу. Подробная сводка данных о способности самых различных соединений угнетать холинэстеразу приведена в обзоре Лонга (Long, 1963).

## ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

### ОТКРЫТИЕ И ЗНАЧЕНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Первые органические производные фосфорной кислоты — метил-, диметил- и триметилфосфины — были синтезированы Тенаром (Thenard) в 1847 г. На первых порах эти соединения не были исследованы более подробно, так как они оказались очень ядовитыми веществами и обладали способностью самовоспламеняться в воздухе. В последней четверти XIX в. большое число фосфорорганических соединений (ФОС), ароматического ряда было описано Михаэлисом и его сотрудниками (Michaelis, 1876).

В 1905 г. А. Е. Арбузов открыл новый путь получения эфиров алкилфосфиновых кислот, получивший название «перегруппировки Арбузова». Этот путь послужил основой для дальнейшего широкого синтеза и изучения органических соединений фосфорной кислоты, проводившегося главным образом А. Е. Арбузовым и его школой. В 1931 г. А. Е. и Б. А. Арбузовыми (Ар-



бузов А. и Арбузов Б., 1932; Арбузов Б., 1957) впервые были получены эфиры пирфосфористой, а также моно- и дитиопирфосфорных кислот и выделен в чистом виде этиловый эфир пирфосфорной кислоты.

В 1932 г. Ланге и Крюгер (Lange, Krüger) синтезировали ряд алкиловых эфиров фторфосфорной кислоты, которые впоследствии получили название эфиров Ланге (А. А. Покровский, 1948). Эти соединения обладали весьма высокой физиологической активностью. Вдыхание их паров через несколько минут приводило к затруднению дыхания, нарушению зрения, повышению чувствительности глаз к свету и другим расстройствам. Работы в направлении дальнейшего синтеза ФОС получили свое развитие в исследованиях Шрадера (1953), занимавшегося изысканием новых инсектицидов в области фторорганических и фосфорорганических соединений. Сначала он получил соединения типа  $R_2-N-SO_2$ ,  $R-SO_2F$  и  $RO-SO_2F$ , которые характеризовались соответственно следующими атомными группировками:  $N-S-F$ ,  $C-S-F$  и  $O-S-F$ . В дальнейшем центральный атом серы был заменен на фосфор. В ходе исследований было установлено, что присутствие фтора не обязательно для проявления ядовитых свойств. В общей сложности Шрадер синтезировал более 2000 фосфорных соединений, которые были изучены с точки зрения их физиологического действия.

В 1940 г. в Кэмбридже Килби (Kilby) синтезировал диметил- и диэтилфторфосфаты, которые оказались высокотоксичными веществами, вызывавшими при отравлении очень быстрое (через несколько минут) наступление смерти. Это послужило началом большой серии химических и токсикологических изысканий, направленных на поиски новых, еще более токсических соединений. В Англии синтетические работы в этой области велись под руководством Мак Комби и Саундерса (McCombie, Saunders, 1946).

Важнейшее биохимическое свойство ФОС — их способность угнетать холинэстеразу — впервые было открыто группой английских исследователей в 1941 г. Результаты этих работ были опубликованы в 1947 г. (Adrian, Feldberg, Kilby, 1947).

Высокая токсичность отдельных представителей ФОС привлекла к себе внимание военных химиков некоторых капиталистических стран, в результате были получены новые ОВ, которые за рубежом получили название «нервных газов». Подробные сведения по токсикологии этих ОВ применительно к задачам санитарно-химической защиты изложены в соответствующих руководствах (Ю. В. Другов, 1959; А. А. Степанов и В. Н. Попов, 1962).

В послевоенные годы исследование ФОС продолжалось и развивалось во многих странах и в настоящее время достигло исключительно широкого размаха. Это легко объяснить тем



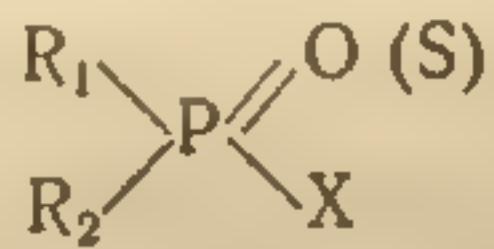
большим и все более расширяющимся интересом, который представляют ФОС для самых различных областей науки и народного хозяйства.

Наиболее важной и распространенной формой практического применения ФОС является использование их в качестве инсектицидов для борьбы с вредителями сельского хозяйства. Не менее важно их применение в таких технологических процессах, как флотация руд, полимеризация, производство растворителей, негорючих пластмасс и др. В последнее время было установлено, что многие ФОС являются активными полифункциональными присадками к смазочным маслам; они совмещают в себе свойства моющих, антикоррозионных и противоиных присадок и к тому же являются деэмульгаторами, антиокислителями и депрессорами (П. И. Санин и др., 1962).

Значительную роль играют ФОС в практической и теоретической медицине. ФОС уже применяются как лекарственные средства для лечения глаукомы, миастении, атонии кишечника. В дальнейшем возможно их использование в качестве средств родоускорения, для химиотерапии туберкулеза и рака, для стимуляции высшей нервной деятельности при психических заболеваниях и т. д. Чрезвычайно велико значение ФОС в теоретических исследованиях, посвященных анализу функции нервной системы, созданию экспериментальных нарушений этой функции, исследованию механизма действия ферментов и др.

### СТРОЕНИЕ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Химическое строение подавляющего большинства фосфорсодержащих инсектицидов и других ФОС, обладающих высокой физиологической активностью, может быть выражено следующей схематической формулой:



$R_1$  и  $R_2$  могут быть различными или одинаковыми алкилами, алкоксилами или алкиламинами.  $X$  представляет собой обычно остаток неорганической или органической кислоты. Чаще всего это фтор или другие галогены,  $CN$ , а также остаток нитрофенола или другого гидроксилзамещенного ароматического или гетероциклического ряда. Имеется большая группа фосфорорганических инсектицидов, в которых на месте  $X$  находится остаток замещенной фосфорной кислоты. В таком случае все соединение представляет собой производное пиродифосфата или другого более сложного полифосфата.

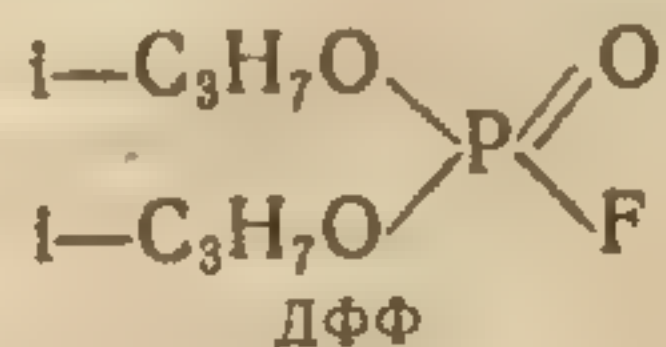
В настоящее время известны десятки тысяч отдельных представителей ФОС, и дать их полный список не представляется



возможным, тем более, что число их возрастает с каждым днем.

Ниже приводится краткая общая характеристика лишь небольшого числа отдельных представителей ФОС, наиболее часто упоминаемых в этой книге.

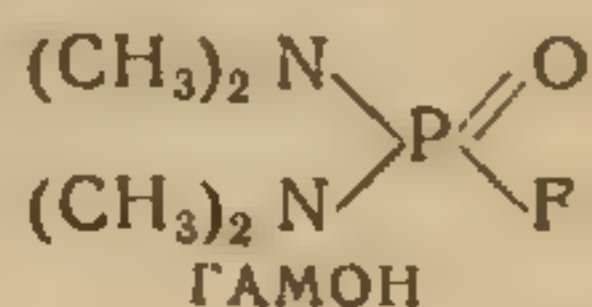
Одним из наиболее широко изученных ФОС и наиболее распространенным во всякого рода теоретических исследованиях является диизопропилфторфосфат (ДФФ):



ДФФ представляет собой бесцветную жидкость с характерным запахом. Температура кипения ДФФ  $71^\circ$  при 10 мм рт. ст. Вещество ограничено растворимо в воде. При опрыскивании тли в концентрации 0,05% вызывает 100%-ную гибель насекомых. В токсикологических работах ДФФ обычно используется в качестве стандартного вещества при сравнительных определениях токсичности и инсектицидного действия.

ДФФ принадлежит к большой группе диэфиров фторфосфорной кислоты, которым посвящены обширные исследования (Sartori, 1951), позволяющие в настоящее время установить некоторые закономерности между химическим строением соединений этого типа и их токсичностью.

Оказалось, что диэфиры с разветвленной цепью являются более токсичными, чем с неразветвленной. При этом ветвление цепи у углерода, соединенного с кислородом, придает соединению более высокую токсичность, чем ветвление в конце цепи. Замена атома фтора на хлор, циан, тиоциан или метиламиногруппу значительно снижает общую токсичность и миотическое действие. Введение одной или нескольких метиленовых групп между атомами фтора и фосфора также резко уменьшает токсичность. Замена кислорода в алкоксигруппе на серу тоже сопровождается падением токсичности. Замена одной или двух алкоксигрупп на диметиламиногруппу, наоборот, приводит к увеличению токсичности; однако соединения с двумя диметиламиногруппами, как, например, гамон, при выраженной токсичности совершенно не обладают миотическими свойствами:



Среди веществ этой группы необходимо упомянуть о двух высокотоксичных соединениях — табуне и зарине, которые были синтезированы в Германии во время второй мировой войны и

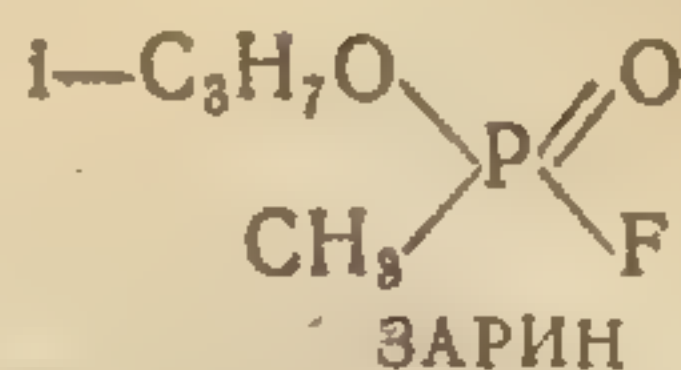
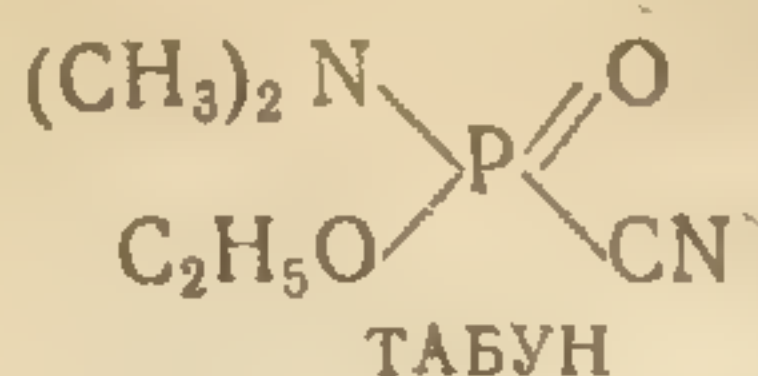
предназначались для  
сражения (Sartori, 1951);  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O

Оба вещества в чистоте  
летучие жидкости. П  
запахом. При 25° для  
600 г табуна и 12 г  
Типичным представителем  
является фосфакол:

Это вещество представляет  
разную жидкость с  
169—170° при 1 мм  
рим в воде (приблизительно  
в обычно применяемых  
растворы фосфаколов  
чистоты. По имеющимся  
в 25 000 раз меньше  
Фосфакол обладает  
действия, однако не  
цида ввиду своей  
ных. Он легко пр  
причиной тяжелых  
Растворы фосфаколов  
тивного средства  
Тиоаналог фосфаколов  
может быть по  
представляет собой  
ной составной частью  
фос), но гла  
ного и т.

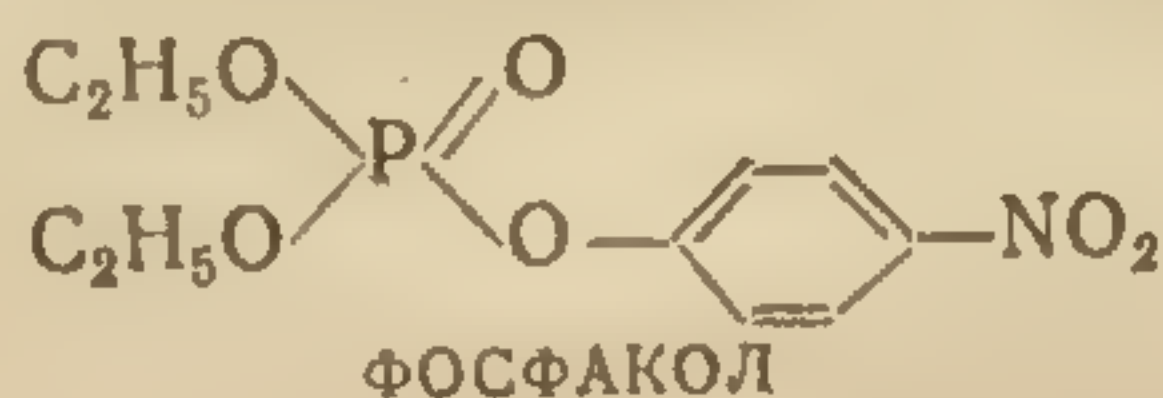


предназначались для использования в качестве химического оружия (Sartori, 1951; O'Brien, 1960):



Оба вещества в чистом виде представляют собой бесцветные, летучие жидкости. Пары табуна обладают слабым фруктовым запахом. При 25° для насыщения 1 м³ воздуха требуется около 600 г табуна и 12 г зарина (Kondritzer, 1956).

Типичным представителем группы фенилдиалкилфосфатов является фосфакол:

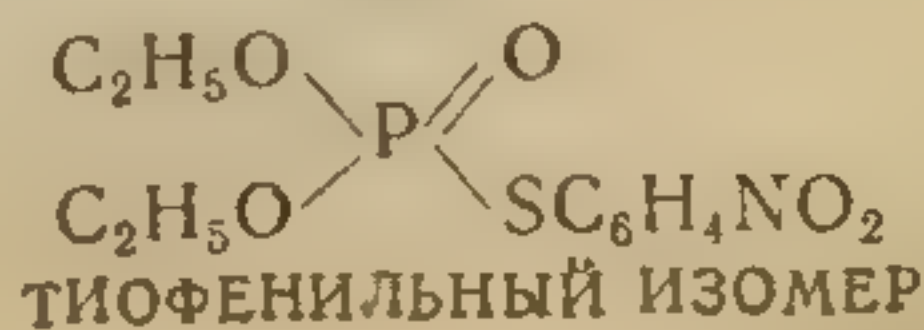
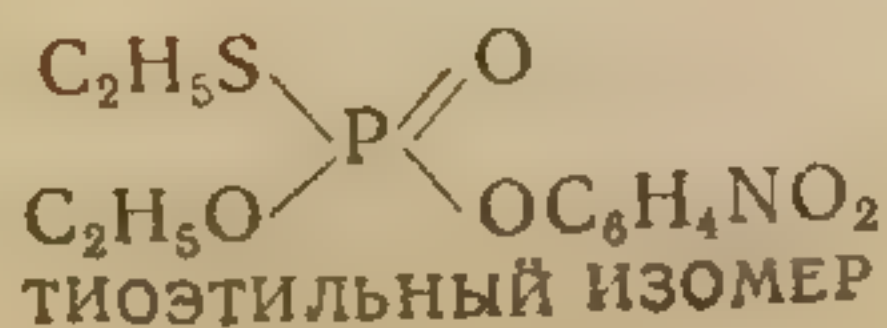
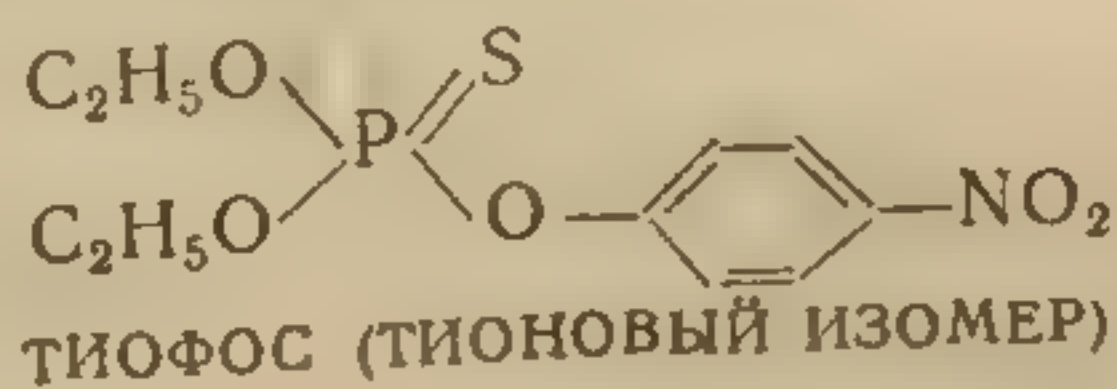


Это вещество представляет собой светло-желтую маслообразную жидкость со слабым запахом. Температура кипения 169—170° при 1 мм рт. ст.,  $d = 1,274$ . Фосфакол плохо растворим в воде (приблизительно 1:1000), но хорошо растворяется в обычно применяемых органических растворителях. Водные растворы фосфакола в нейтральной среде чрезвычайно устойчивы. По имеющимся данным, скорость его гидролиза в воде в 25 000 раз меньше, чем скорость гидролиза ТЭПФ.

Фосфакол обладает широким спектром инсектицидного действия, однако не получил распространения в качестве инсектицида ввиду своей высокой токсичности для человека и животных. Он легко проникает через кожу человека и может быть причиной тяжелых отравлений.

Растворы фосфакола нашли применение в качестве эффективного средства для лечения глаукомы.

Тиоаналог фосфакола — тиофос (паратин) лишь с трудом может быть получен в чистом виде. В обычных условиях он представляет собой смесь изомеров, в которую в качестве главной составной части входит тионовый изомер (собственно тиофос), но где содержится также некоторое количество тиоэтильного и тиофенильного изомеров:

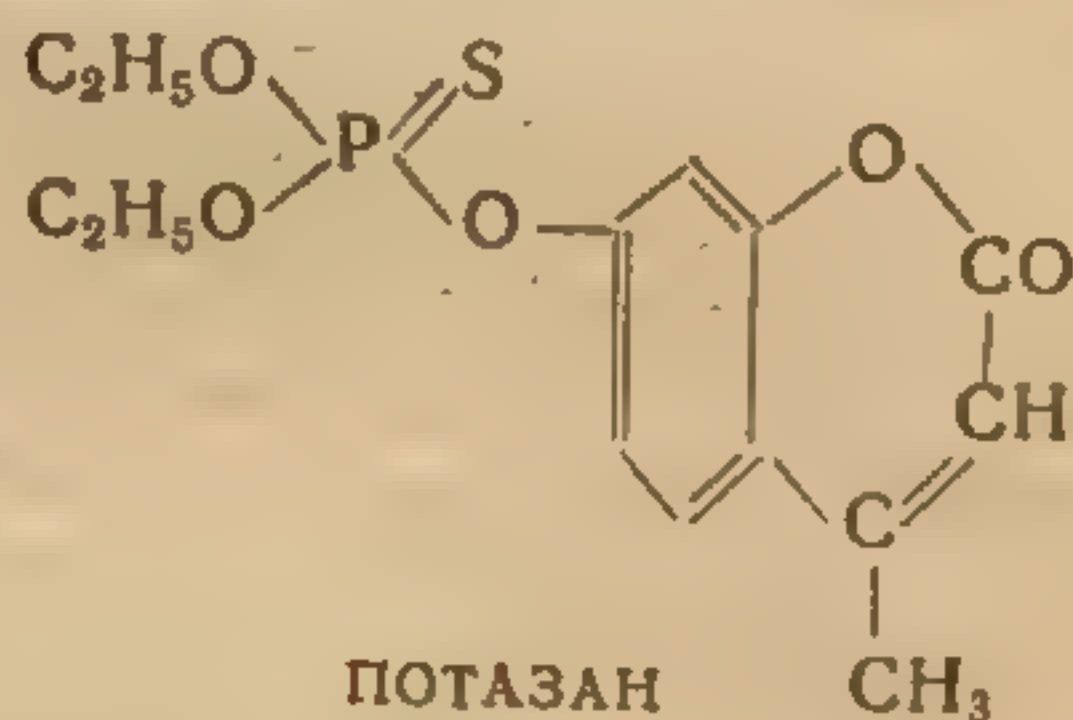




Технический препарат содержит до 80% тиофоса и представляет собой темно-коричневую жидкость с сильным чесночным запахом, обусловленным примесями. Температура кипения 115—117° при 0,03 мм рт. ст. В обычных органических растворителях тиофос растворяется хорошо, растворимость в воде 0,015—0,02 г/л при 20°. В практике применяются 1%-ный dust-препарата и 30%-ная эмульсия, которая разводится водой до рабочих концентраций растворов (Е. И. Спыну, 19576).

Исследования Диггла и Гэйджа (Diggl, Gage, 1951) показали, что только два последних соединения — тиоэтильный и тиоэфенильный изомеры — обладают мощным антихолинэстеразным действием и придают всей смеси ее специфические свойства. По данным Килби (Kilby, 1954), Р = S изомер тиофоса, будучи введенным в организм кролика, приобретает антихолинэстеразную активность, которой он был лишен ранее. Это изменение свойств может быть связано с ферментативной изомеризацией тиофоса, в результате чего возникают активные тиоэтильный и тиофенильный изомеры, или с окислением препарата в фосфакол. В связи с этими превращениями для данного соединения характерно более медленное развитие интоксикации по сравнению с отравлением фосфаколом.

Тиофос значительно менее токсичен для животных, чем фосфакол, но обладает превосходно выраженными инсектицидными свойствами. Он характеризуется широким спектром инсектицидного действия и по многим соображениям удобен для практического применения. Все это привело к широкому распространению тиофоса в качестве ценного средства для борьбы с сельскохозяйственными вредителями.

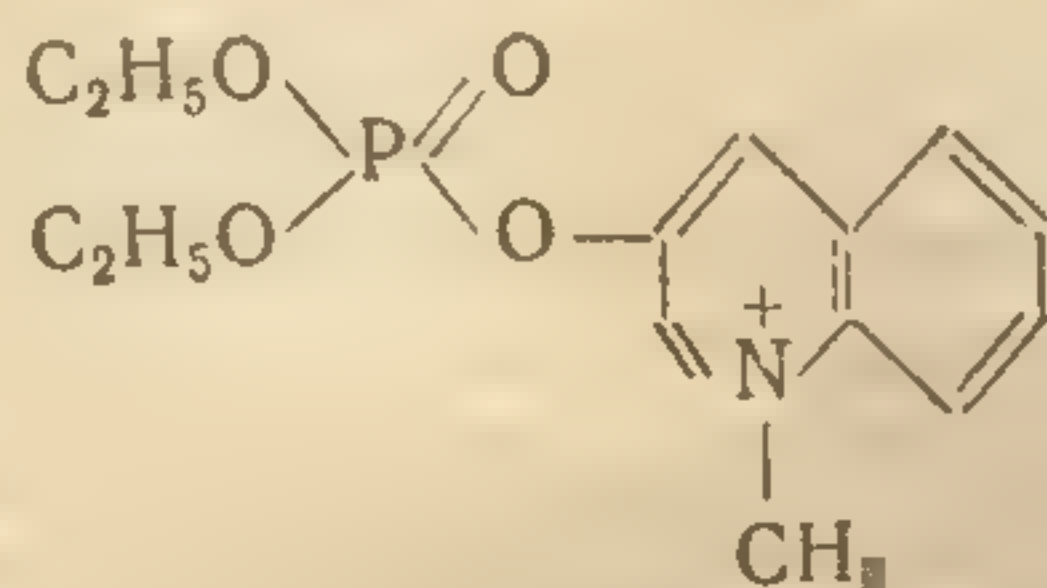


ПОТАЗАН

Заслуживает упоминания инсектицид потазан, который представляет собой бесцветный кристаллический порошок с температурой плавления 38° и  $d = 1,260$ . Потазан плохо растворим в воде, но растворяется в большинстве органических растворителей. Он сравнительно мало токсичен для животных, но обладает избирательным действием в отношении картофельного жука. Это делает его весьма ценным практическим средством, так как эти насекомые обладают выраженной устойчивостью ко многим инсектицидам — например, к тиофосу (Шрадер, 1953).

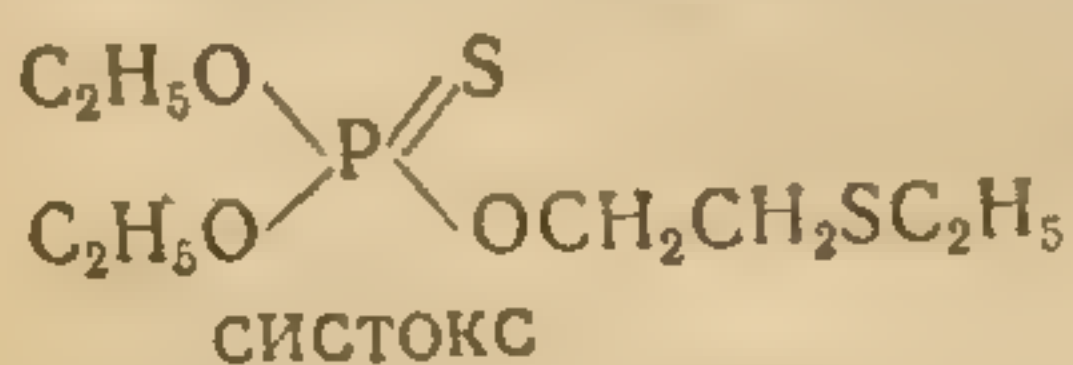


Близкий к потазану по строению N-метилхинолинийдиэтилфосфат представляет собой чрезвычайно токсичное соединение и является одним из наиболее мощных ингибиторов холинэстеразы среди ФОС. В концентрации  $3 \cdot 10^{-10}$  М он угнетает активность истинной холинэстеразы на 50%.

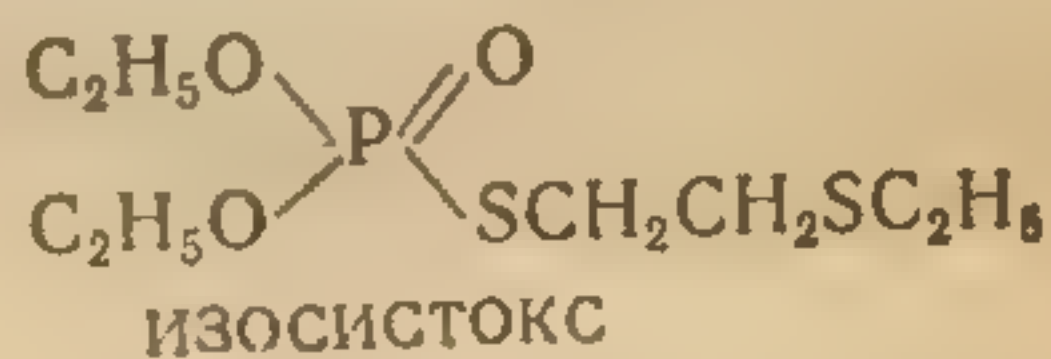


Н-МЕТИЛХИНОЛИНИЙДИЭТИЛФОСФАТ

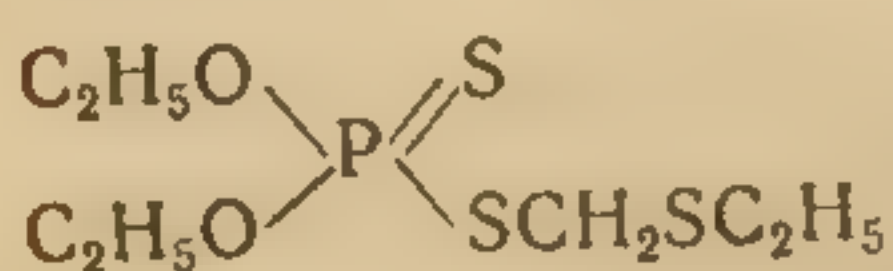
Представляет интерес большая группа ФОС, содержащих в группе Х меркаптопроизводные. Среди них встречаются соединения, имеющие как группировку  $\text{P}=\text{O}$ , так и  $\text{P}=\text{S}$ . Многие из них нашли широкое применение в качестве инсектицидов. Среди главных представителей этой группы можно назвать систокс, изосистокс, тимет, малатион и другие.



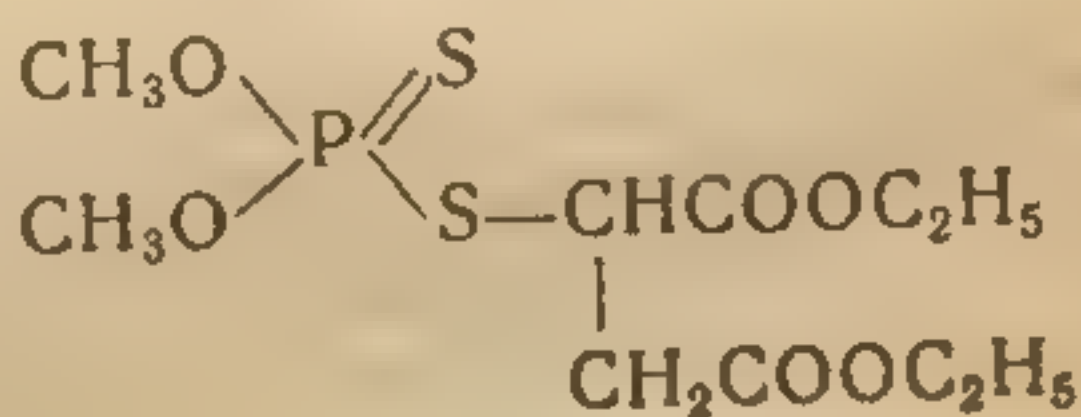
СИСТОКС



ИЗОСИСТОКС



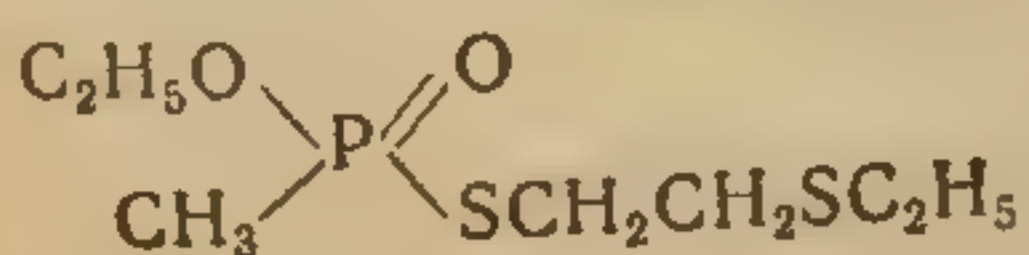
ТИМЕТ



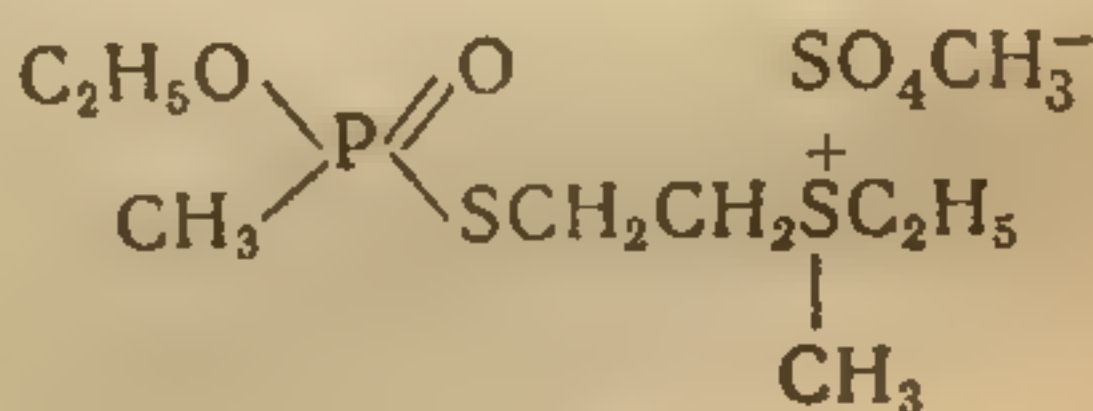
МАЛАТИОН

Большинство веществ этого типа обладают сравнительно низкой токсичностью для млекопитающих и вместе с тем высокоэффективны в отношении многих видов насекомых.

Введение в молекулу соединений этого типа положительного заряда путем превращения сульфидной серы в сульфониевую (например, с помощью сульфометилирования) значительно повышает их антихолинэстеразную активность, токсичность и биологическую эффективность. Наиболее изучены подобные превращения для производных этоксиметилфосфиновой кислоты:



ГД-7



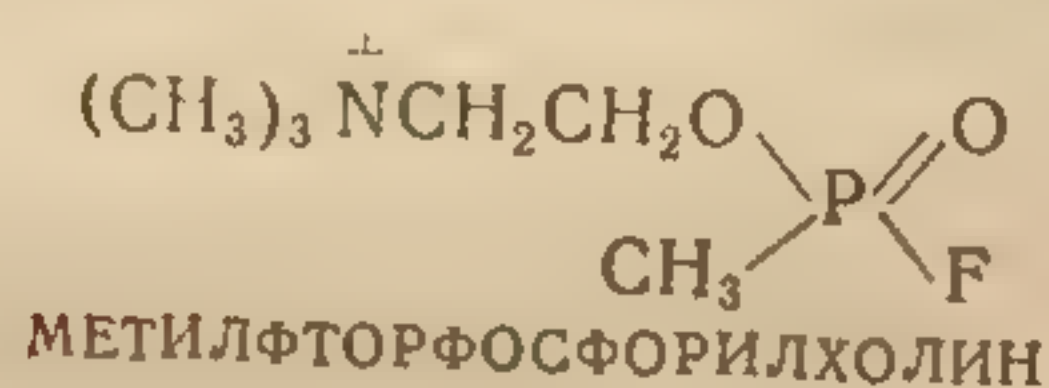
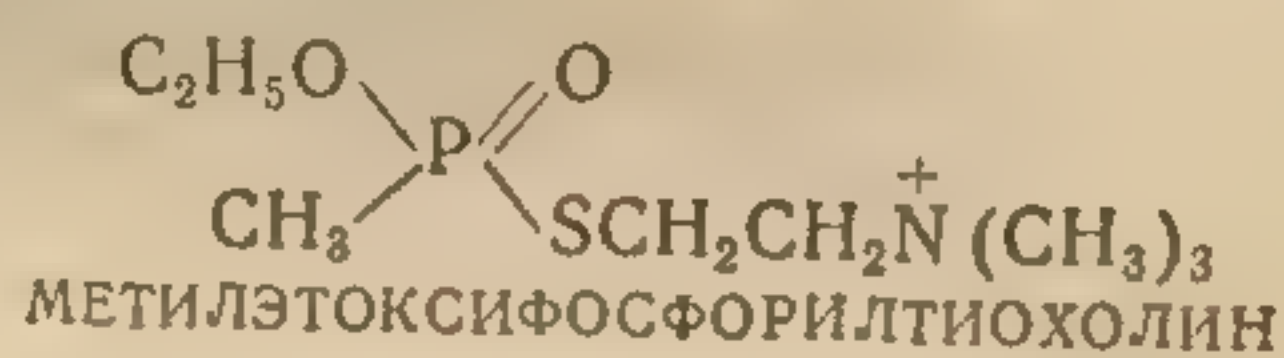
ГД-42

Например, при переходе от ГД-7 к ГД-42 антихолинэстеразная активность возрастает в 3500 раз (В. А. Яковлев и Р. И. Вол-



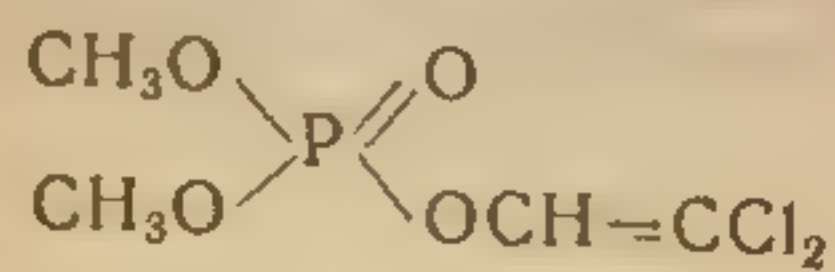
кова, 1962), а некоторые показатели биологической активности — например, способность вызывать остаточную контрактуру мышцы после сокращения, вызванного непрямым раздражением, или способность сенсibilизировать мышцу к ацетилхолину — в 8—10 тысяч раз (Р. И. Волкова и др., 1961).

Среди ФОС, имеющих в своей молекуле положительный заряд, необходимо упомянуть группу соединений, являющихся производными холина или тиохолина и поэтому особенно близких по строению к естественному субстрату холинэстеразы — ацетилхолину (Tammelin, 19586). Эти соединения называют фосфорилхолинами. Холиновый остаток может представлять собой группу X, связанную с фосфором ангидридной связью (метилэтоксифосфорилтиохолин), но может быть и одной из групп R (метилфторфосфорилхолин).

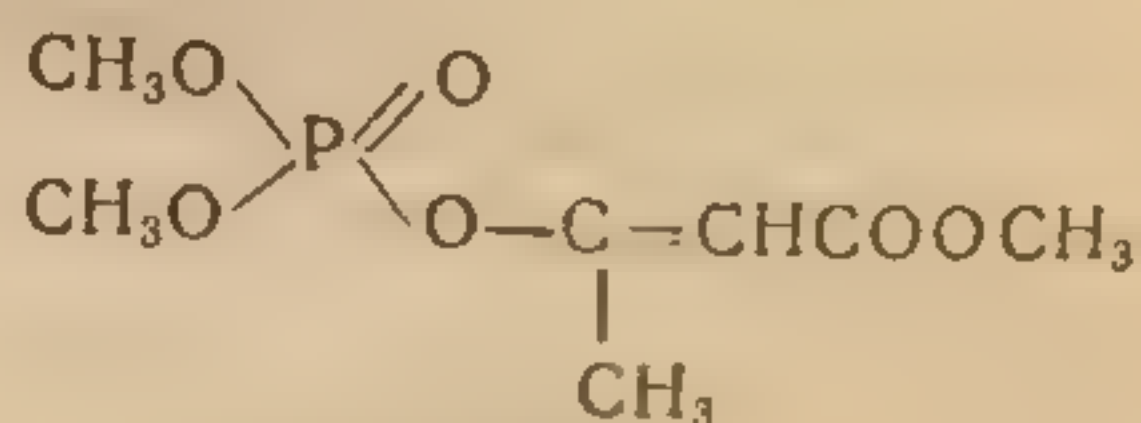


Многие из веществ этого типа отличаются исключительно высокой токсичностью и антихолинэстеразной активностью.

Интересна группа не содержащих серы инсектицидов, у которых остаток X представляет собой производное непредельного углеводорода. Многие из веществ такого типа — например, ДДВФ, фосдрин и др. — имеют широкое практическое применение в сельском хозяйстве.

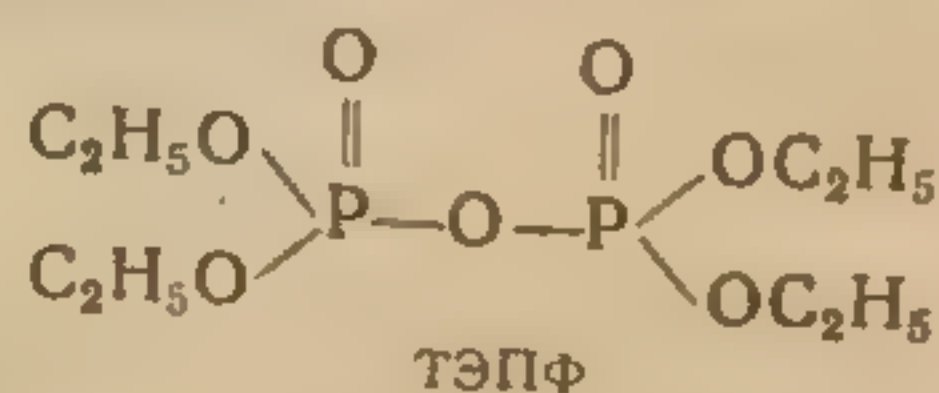


ДДВФ



ФОСДРИН

Среди ФОС, являющихся производными пиродифосфорной кислоты, в первую очередь необходимо упомянуть ТЭПФ (тетраэтилпиродифосфат):



ТЭПФ был впервые получен Мошниным в лаборатории Вюрца в 1850 г. (Шрадер, 1953). Позже другим методом его

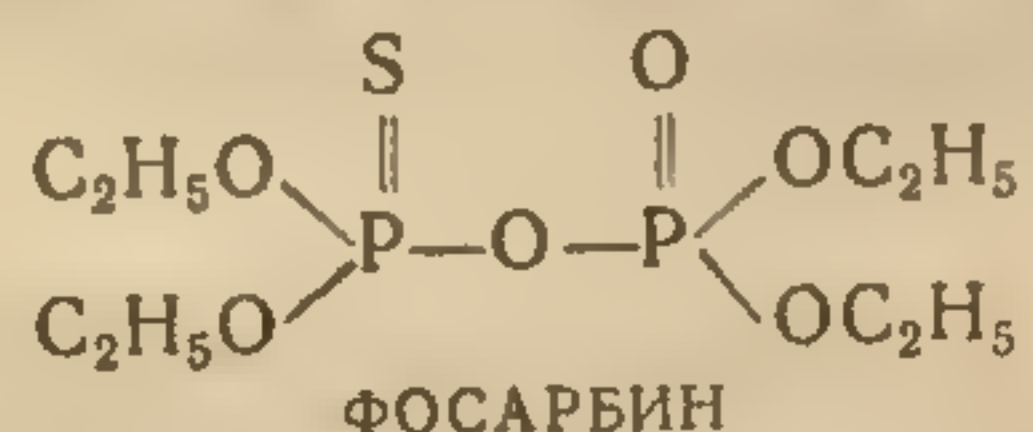


синтезировали А. Е. и Б. А. Арбузовы (1932). ТЭПФ представляет собой жидкость с приятным запахом, смешивающуюся с водой; обладает выраженной гигроскопичностью. Температура кипения 140—142° при 2 мм рт. ст.,  $d = 1,184$ . ТЭПФ более токсичен для тли, чем ДФФ, и 100%-ную гибель вызывает при опрыскивании в концентрации 0,001%. ТЭПФ высокотоксичен для животных.

Описан также гексаэтилтетрафосфат, представляющий собой смесь этилполифосфатов довольно неопределенного состава. Действующим началом этой смеси является ТЭПФ.

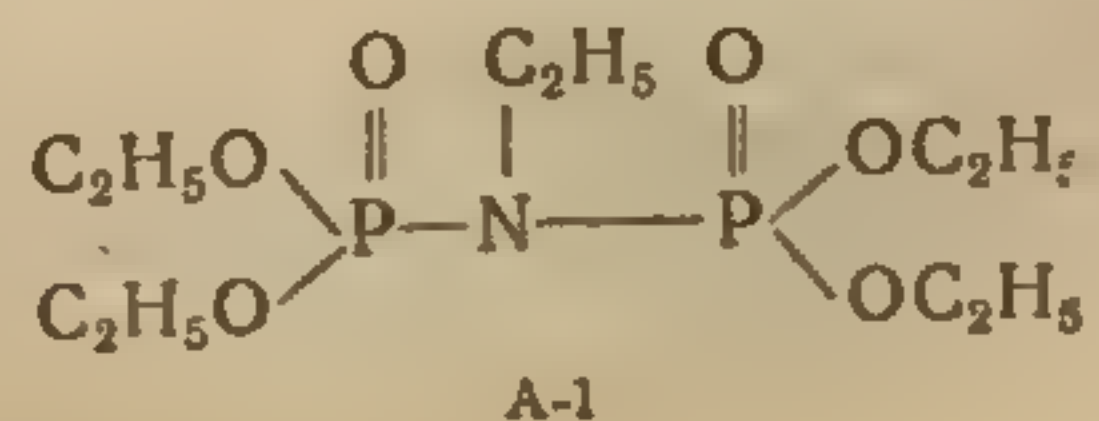
Гексаэтилтетрафосфат под названием бладан получил широкое распространение в качестве полноценного заменителя никотина для уничтожения тлей, гусениц и других вредителей растений. По физическим свойствам бладан — густая смолообразная жидкость желто-бурого цвета. Он сильно гигроскопичен, смешивается с водой во всех отношениях и хорошо растворяется во многих органических растворителях,  $d = 1,271$ .

Очень близок к ТЭПФ по строению фосарбин (пирофос), который отличается от ТЭПФ только тем, что один из кислородов, связанных с фосфором двойной связью, замещен на серу:



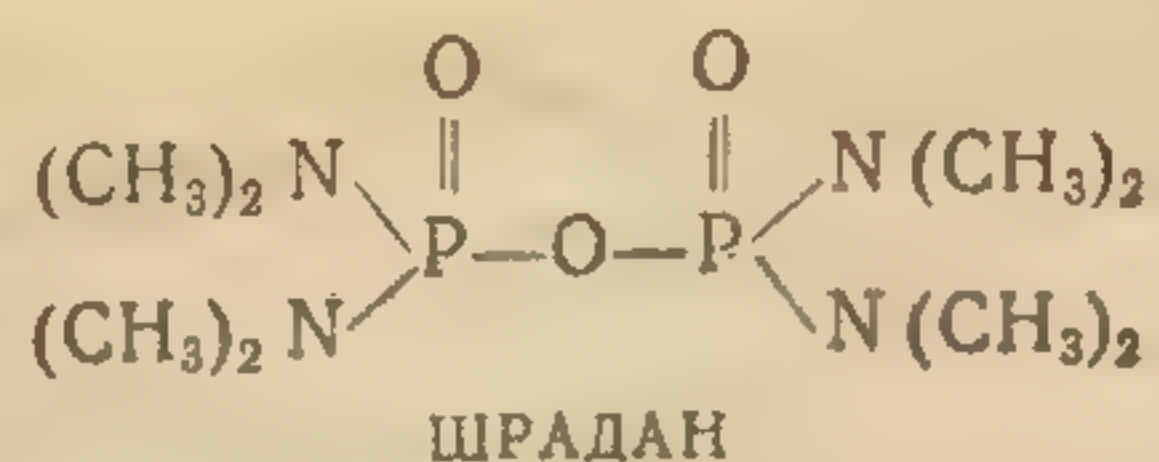
Фосарбин обладает выраженным антихолинэстеразным действием и в настоящее время широко изучается в качестве возможного средства для лечения глаукомы, послеоперационных парезов и параличей кишечника, периферических параличей при невритах лицевого и лучевого нервов и др. (Б. Б. Шугаев, 1957б; В. Н. Асекритова, 1962).

Значительный интерес представляет группа замещенных амидофосфатов, у которых амидная группа является общей для двух остатков фосфорорганических кислот. Благодаря этому их можно рассматривать как аналоги пирофосфорной кислоты, в которых связь между двумя атомами фосфора осуществляется не за счет кислорода, а за счет азота. Среди веществ этого ряда многие обладают выраженной инсектицидной активностью и в низких концентрациях угнетают активность холинэстеразы (Б. Б. Шугаев, 1957а, б). Типичным представителем этой группы соединений может служить этил-бис-(диэтилфосфорил)-амид (А-1):



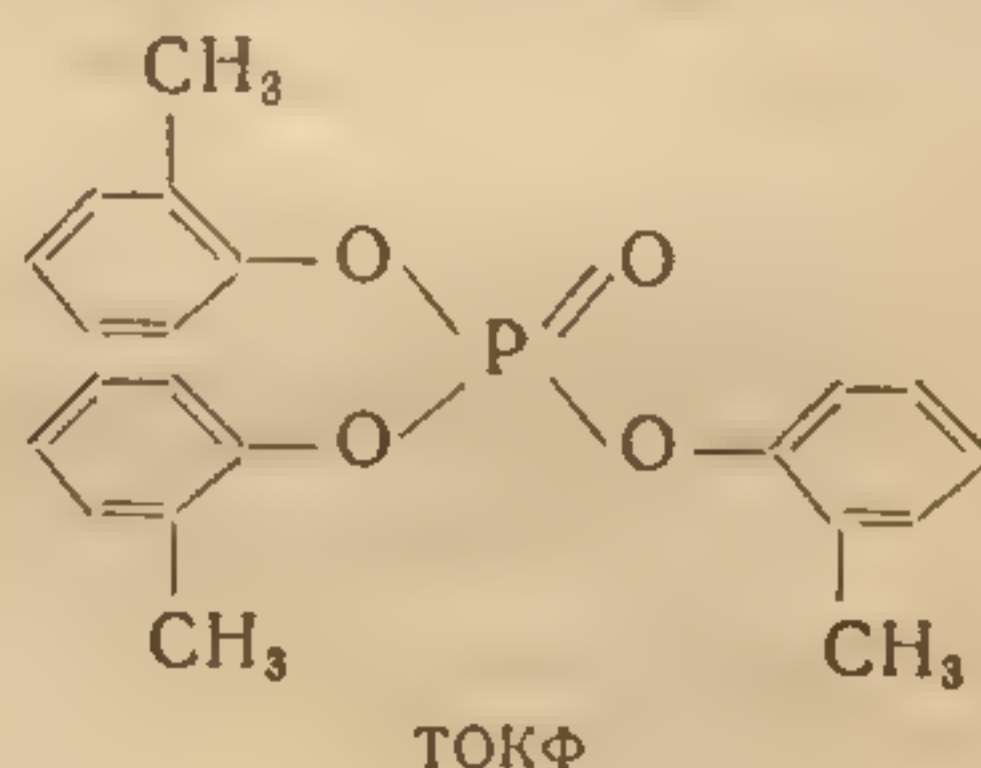


Производным пирогосфорной кислоты является также шрадан (октаметил, ОМПА), который широко применяется в качестве инсектицида:



Шрадан в чистом виде лишен антихолинэстеразных свойств, но приобретает их, попав в организм животных. При этом происходит ферментативное окисление шрадана, в результате чего он превращается в весьма токсичное и обладающее выраженным антихолинэстеразным действием соединение (Casida et al., 1954).

К числу веществ, приобретающих антихолинэстеразные свойства только в организме животных или при инкубации со срезами тканей, относится также триортокрезилфосфат (ТОКФ):



В этом разделе были перечислены и кратко охарактеризованы лишь немногие представители обширного класса ФОС. Упомянутые здесь соединения, а также некоторые другие будут более подробно рассмотрены в последующих главах книги.

### ОБЗОР ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

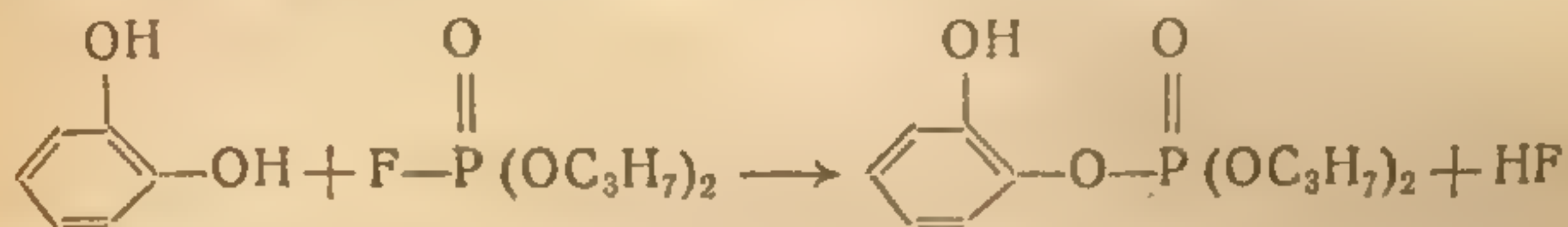
ФОС относятся к веществам с чрезвычайно высокой реакционной способностью и охотно вступают в реакции самого различного типа. Подробные данные по этому вопросу приведены в ряде монографий и обзоров (Larsson, 1958; O'Brien, 1960; Сондерс, 1961; Heath, 1961, и др.). Здесь мы кратко рассмотрим лишь те реакции, которые имеют непосредственное отношение к судьбе ФОС в организме и к механизму их биологического действия. Главная реакция, в которую особенно легко вступают ФОС и которая определяет их биологическую активность и, в частности, их токсичность, а именно реакция фосфорилирования холинэстеразы, будет рассмотрена в следующей главе.



## ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

ФОС обладают способностью фосфорилировать не только холинэстеразу, но и многие значительно более просто построенные соединения.

Яндорф и др. (Jandorf et al., 1952) показали, что ДФФ легко реагирует с пирокатехином и другими полифенолами, имеющими рядом расположенные ОН-группы. Реакция протекает по следующей схеме:



Образующийся в результате реакции эфир был выделен и идентифицирован. Оказалось, что с пирокатехином реагирует только 1 молекула ДФФ, хотя наличие второго незамещенного гидроксила является обязательным условием для протекания реакции. Есть основание полагать, что пирокатехин реагирует в ионизированном виде (в форме фенолята), так как при увеличении рН скорость реакции возрастает. С такой же скоростью, как пирокатехин, с ДФФ реагировал 3,4-диоксифенилаланин, а пирогаллол и галловая кислота реагировали еще быстрее.

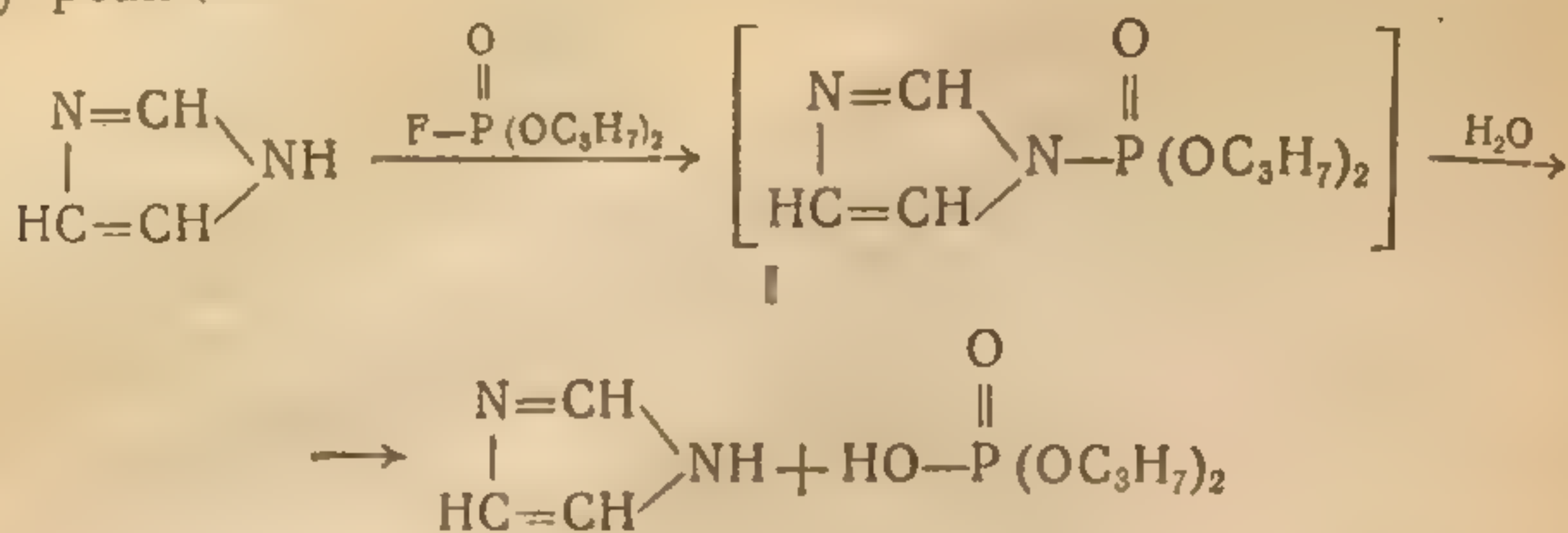
Аугустинссон (Augustinsson, 1952) показал, что по такой же схеме протекает реакция полифенолов с табуном. Им отмечена выраженная способность табуна взаимодействовать с адреналином. Берри и др. (Berry et al., 1955) опубликовали данные о способности зарина вступать во взаимодействие с самыми различными веществами. Реакция зарина с исследуемыми веществами оценивалась по их способности защищать холинэстеразу от инактивирующего влияния зарина. Из большого числа испытанных веществ выраженным защитным действием обладали только 3,4-диоксифенилаланин и некоторые его производные, а также пирокатехин и 1,2,4-триоксибензол. Диоксифенилаланин защищал холинэстеразу также от инактивирующего действия этильного гомолога зарина, табуна и других фосфорорганических соединений.

Ашболт и Райдон (Ashbolt, Rydon, 1957) изучали прямое взаимодействие некоторых ФОС с аминокислотами. Они показали, что в мягких условиях (температура 38°, рН = 7—8) ДФФ хорошо реагирует с гидроксильной группой тирозина, а ТЭПФ, кроме того, с аминогруппой фенилаланина и с амино- и гидроксильными группами серина. Продукты реакции были выделены и идентифицированы. Оказалось, что реакция состоит в фосфорилировании соответствующих групп аминокислот.

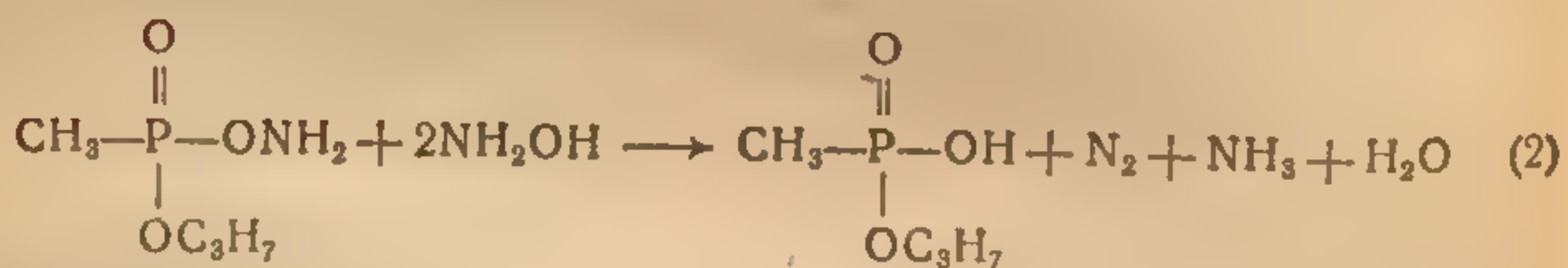
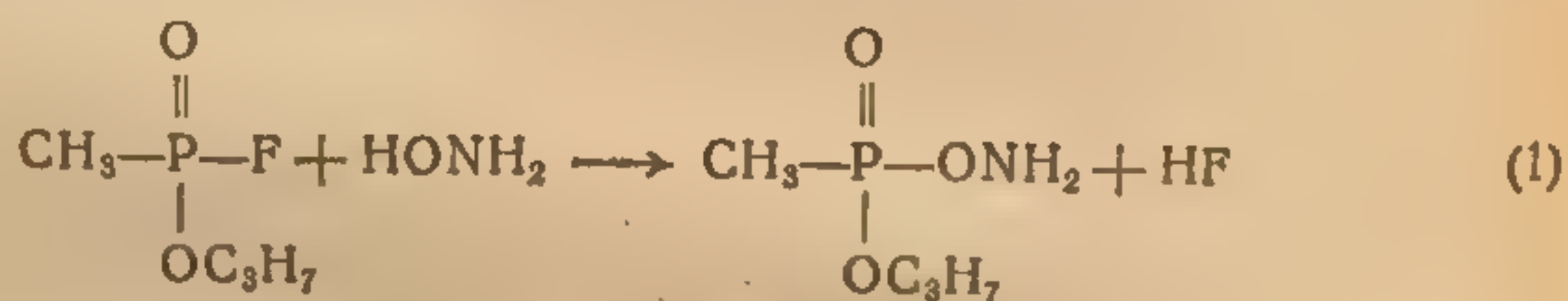
По данным Вагнер-Яурегга и соавт. (Wagner-Jauregg, Hackley, 1953), ДФФ может реагировать также с азотом пиридино-



вого или имидазольного ядра. Автор предложил следующую схему реакции:



По этой схеме промежуточный продукт (I) — фосфорилированный имидазол — является нестойким соединением и легко подвергается гидролизу с образованием имидазола и диизопропоксифосфорной кислоты. Таким образом, имидазол можно рассматривать как катализатор гидролитического расщепления ДФФ. Аналогичным образом происходит взаимодействие ФОС с гидроксиламином. Яндорф (Jandorf, 1956) показал, что зарин и ДФФ быстро реагируют с гидроксиламином в мягких условиях (рН = 7,5; 25°). Эта реакция протекает в два этапа. На первом этапе происходит фосфорилирование гидроксилана и отщепляется фтористоводородная кислота. На втором этапе фосфорилированный продукт вступает во взаимодействие еще с двумя молекулами гидроксилана, в результате чего образуется изопропоксиметилфосфиновая кислота и выделяются азот, аммиак и вода:



Таким образом, и здесь в конечном счете образуется продукт гидролиза зарина, но гидроксилан не выходит из реакции в неизменном виде, как это происходило с имидазолом, а разрушается полностью.

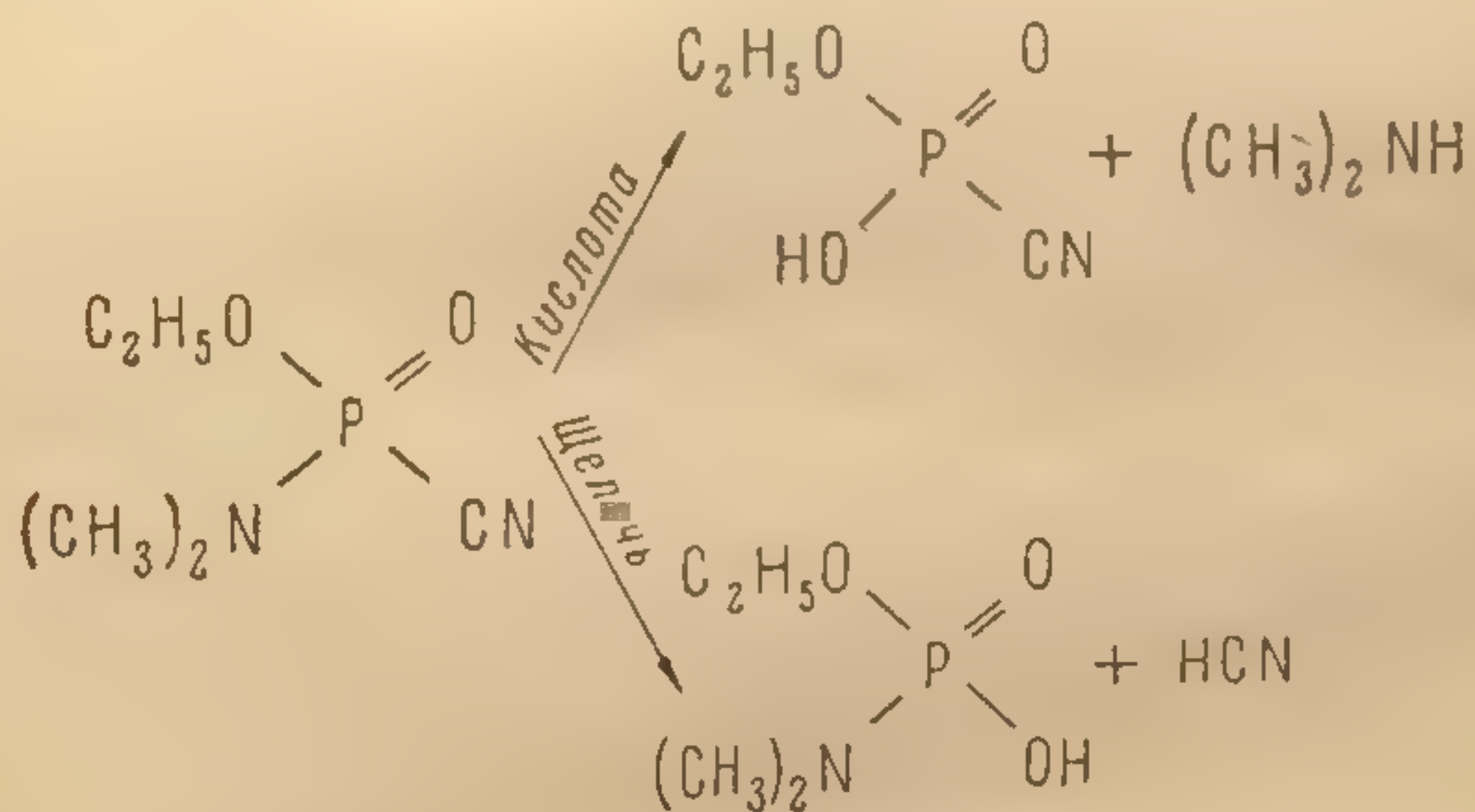
При действии ФОС на некоторые производные гидроксилана образуются стойкие фосфорилированные продукты. Так, взаимодействие зарина с амидоксимами типа  $\text{RC}(\text{NH}_2) = \text{NH}$  приводит к образованию устойчивых к гидролизу веществ, имеющих строение  $\text{RC}(\text{NH}_2) = \text{NO}-\text{PO}(\text{CH}_3)\text{OC}_3\text{H}_7$  (Plapinger, Owens, 1956).



## ГИДРОЛИЗ

Все ФОС с разной степенью легкости подвержены реакции гидролитического расщепления. Теоретически любая группировка, соединенная с атомом фосфора, может отщепиться под действием воды, но легче всего, особенно в щелочных условиях, отщепляется группа X, соединенная с фосфором ангидридной связью.

Труднее всего отщепляются алкоксигруппы. Направление гидролиза в очень большой степени зависит от pH среды. Ярче всего это видно на примере табуна, который в кислой среде распадается с отщеплением диметиламиногруппы, а в щелочной — образует синильную кислоту (Larsson, 1952; Holmstedt, 1951):

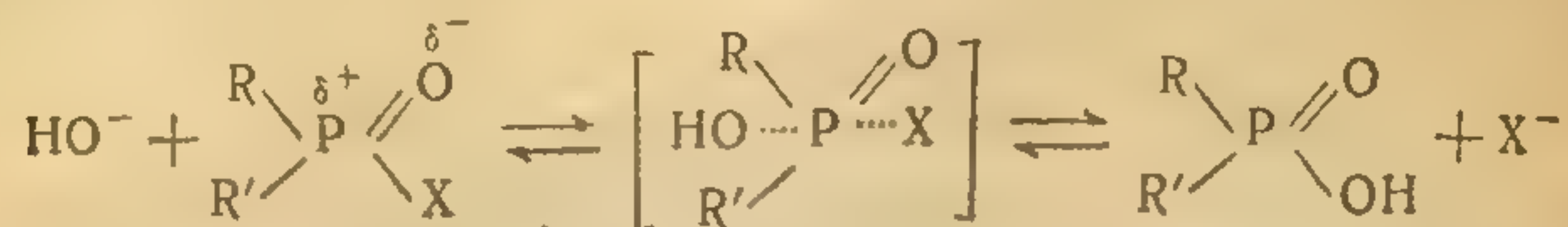


Практически наибольший интерес представляет разрыв ангидридной связи, так как этот путь гидролиза свойствен всем ФОС, и именно по этому пути чаще всего происходит их ферментативное разрушение в организме. Скорость спонтанного гидролиза различных ФОС варьирует в очень широких пределах. Например, табун гидролизует в 10 млн. раз быстрее, чем фосфакол (Heath, 1956).

Наиболее полно изучен щелочной гидролиз ФОС, осуществляемый под действием гидроксильных ионов. Он представляет собой нуклеофильную реакцию замещения, при которой гидроксил замещает собой ангидридную группу X. Можно представить себе, что гидроксильный ион, обладающий резко выраженными нуклеофильными свойствами, внедряется в молекулу ФОС и присоединяется к атому фосфора, который, как известно, содержит некоторый избыток положительного заряда благодаря поляризации P=O группы. При этом ангидридная связь P—X

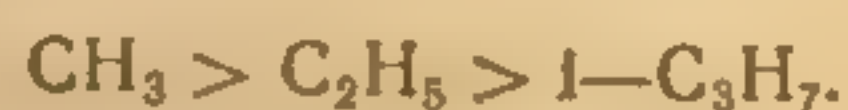


становится более слабой, остаток X отщепляется и на его место становится гидроксил:



Щелочной гидролиз ФОС протекает по бимолекулярному механизму, т. е. скорость его пропорциональна концентрации обоих участников реакции: ФОС и гидроксильных ионов. Поэтому мерой скорости гидролиза может служить константа скорости второго порядка. Из приведенной схемы видно, что скорость гидролиза зависит от величины положительного заряда у атома фосфора, и поэтому при одной и той же группе X должна зависеть от характера других заместителей у фосфора, природа которых может существенно влиять на величину этого заряда. Известно большое число исследований, в которых изучалась зависимость скорости щелочного гидролиза ФОС от их строения. Хорошая сводка этих данных приведена в монографии Хита (Heath, 1961).

Выраженное замедление скорости гидролиза происходит при переходе от фосфатов к фосфотионатам, т. е. при замене группы  $\text{P}=\text{O}$  на  $\text{P}=\text{S}$ . Например, паратион гидролизруется в 10 раз медленнее, чем фосфакол. В то же время замена эфирного кислорода на серу, т. е. переход от фосфата к фосфотиолату, сопровождается очень резким ускорением гидролиза. Так, соединение  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{S})(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{F}$  гидролизруется в 320 раз быстрее, чем его кислородный аналог  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{F}$ ; S-этильный изомер паратиона  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{S})(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$  имеет константу гидролиза в 470 раз более высокую, чем фосфакол, отличающийся от него только тем, что вместо серы он содержит кислород. Замена алкоксигруппы на диалкиламиногруппу резко тормозит гидролиз. Например, диэтилфторфосфат  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{F}$  гидролизруется в 2100 раз быстрее, чем бис-(диэтиламино)-фторфосфат  $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}]_2\text{P}(\text{O})\text{F}$ . В алкилфосфатах с увеличением размеров алкильного радикала скорость гидролиза снижается в ряду:



Водный гидролиз многих ФОС может быть значительно ускорен добавлением различных катализаторов. В разделе «Фосфорилирование» уже отмечалось, что имидазол и гидроксилламин можно рассматривать как катализаторы гидролиза ФОС, потому что продукты фосфорилирования этих веществ под действием ФОС нестойки и быстро спонтанно разрушаются с образованием продуктов гидролиза ФОС. Точно по такому же механизму происходит ускорение гидролиза ДФФ и зарина под



действием гидроксамовых кислот. Хакли и др. (Hackley et al., 1955) исследовали влияние более чем 30 подобных кислот и показали, что многие из них очень резко ускоряют гидролиз ФОС. Например, в присутствии бензгидроксамовой и никотингидроксамовой кислот период полураспада ДФФ в воде уменьшался с 2500 до 20—22 мин. В случае гидролиза зарина наиболее активные из изученных соединений снижали период полураспада с 30 до 1—2 мин. В исследованном ряду соединений четвертичные аммониевые производные оказались худшими катализаторами, чем их третичные аналоги. Так, в присутствии изоникотингидроксамовой кислоты период полураспада ДФФ составлял 28 мин, а в присутствии ее йодметилата — только 73 мин. Многие альдоксимы и кетоксимы (пиридинальдоксим, моноизонитрозоацетон, диацетилмоноксим и др.) тоже оказались выраженными катализаторами гидролиза ФОС. Некоторые из них чрезвычайно сильно (в несколько тысяч раз) ускоряли гидролиз ДФФ, ТЭПФ, зарина и фосфакола (Green et al., 1958; Green, Smith, 1958).

Изучение зависимости этого эффекта от pH показало, что во всех случаях действующим началом является анион оксима, так как скорость реакции не зависела от концентрации неионизированной формы, но всегда была пропорциональна концентрации аниона (Green, Saville, 1956).

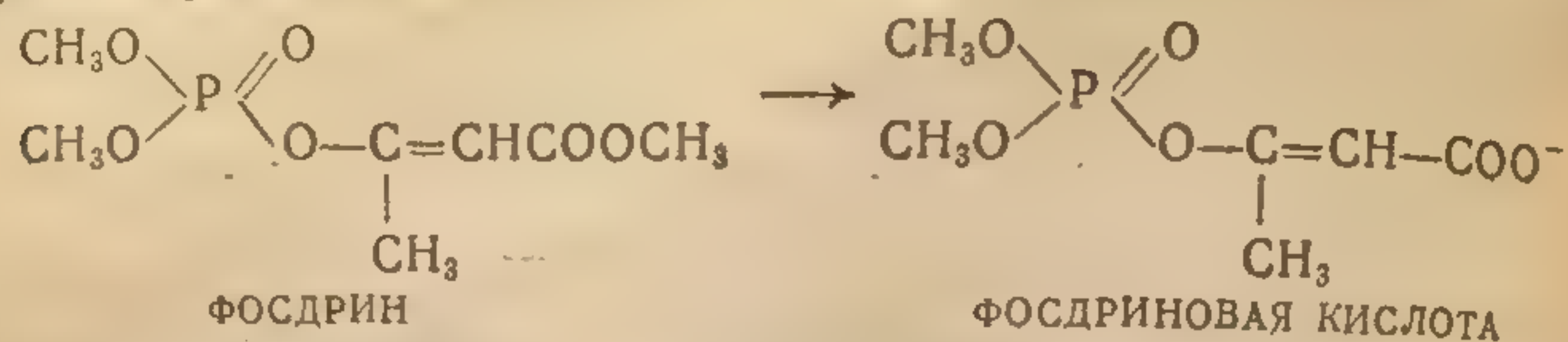
Многие неорганические анионы тоже обладают способностью катализировать гидролиз ФОС. По данным Аугустинссона (Augustinsson et al., 1958), ионы  $[\text{Mo}(\text{MoO}_4)_6]^{6-}$  ускоряли гидролиз табуна почти в 12 раз, ионы  $\text{MoO}_4^{2-}$  — на 175%,  $\text{WO}_4^{2-}$  — на 159%,  $\text{VO}_3^-$  — на 81%,  $\text{CrO}_4^{2-}$  — на 52%. В то же время ионы фтора практически полностью тормозили гидролиз табуна.

Чрезвычайно эффективными катализаторами гидролиза ФОС оказались внутрикомплексные соединения (хелаты) меди (Wagner-Jauregg et al., 1955). Было показано, что при применении эквимолекулярной смеси комплексобразователя и  $\text{CuSO}_4$  лизин снижал скорость полураспада ДФФ с 2500 до 23 мин, треонин — до 18 мин, имидазол — до 14 мин, гистидин — до 8 мин, а самый эффективный —  $\alpha, \alpha$ -дипиридил — до 4,5 мин. С увеличением pH скорость гидролиза возрастала. Внутрикомплексные соединения кобальта и никеля оказались значительно менее эффективными, а хелаты железа и марганца совсем не ускоряли гидролиза ДФФ.

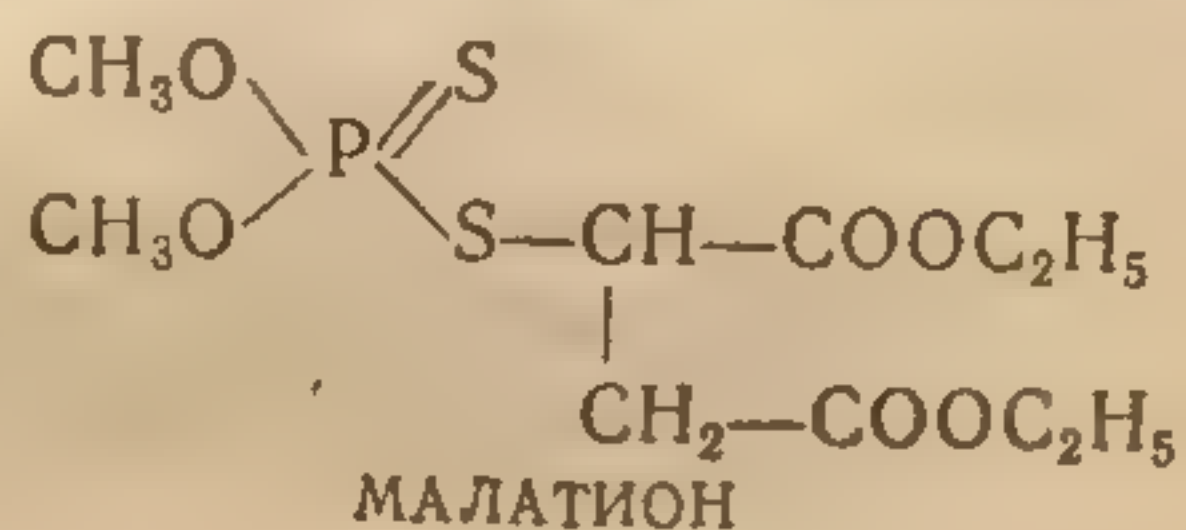
При обсуждении реакций гидролиза ФОС необходимо упомянуть о таких соединениях, которые в кислотной группе X содержат сложноэфирную связь. Разрушение этой связи, сопровождающееся появлением карбоксильного иона, делает всю молекулу более прочной и менее подверженной дальнейшему



гидролизу. Типичным примером таких соединений может служить фосдрин:



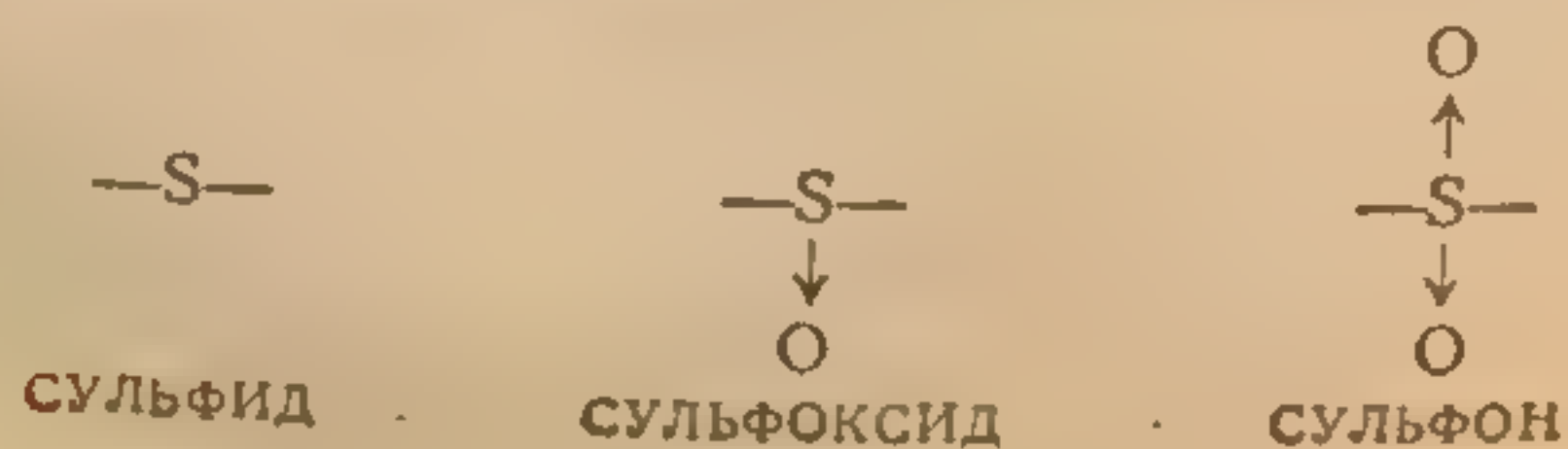
Аналогичным образом изменяются свойства малатиона при гидролизе одной или обеих сложноэфирных связей в его кислотной группе:



### ОКИСЛЕНИЕ

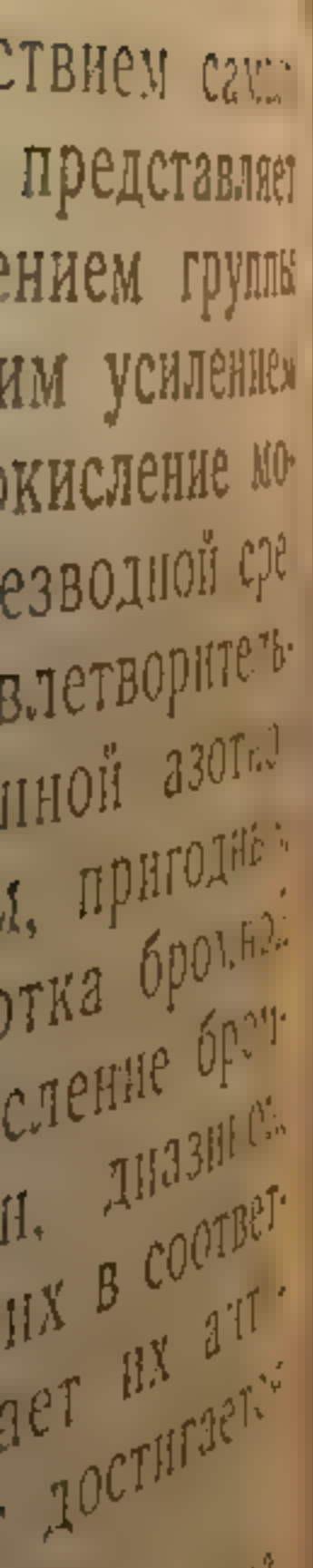
Многие ФОС способны окисляться под действием самых различных окислителей. Наибольший интерес представляет окисление фосфотионатов, связанное с превращением группы  $\text{P}=\text{S}$  в  $\text{P}=\text{O}$ . Эта реакция сопровождается резким усилением антихолинэстеразных свойств соединения. Такое окисление может быть осуществлено надуксусной кислотой в безводной среде (Krueger et al., 1959; Plapp, Casida, 1958). Удовлетворительные результаты дает применение концентрированной азотной кислоты (O'Brien, 1957). Очень удобным методом, пригодным для работы в водных растворах, является обработка бромной водой. Халман (Halmann, 1959) показал, что окисление бромной водой таких фосфотионатов, как паратион, диазинон, малатион, метилпаратион и другие, превращает их в соответствующие фосфаты и в 1000—10 000 раз усиливает их антихолинэстеразную активность. Аналогичный эффект достигается при окислении N-бромсукцинимидом (Cook, 1955).

Окислению может подвергаться также сульфидная сера, содержащаяся в кислотной группе некоторых инсектицидов. Так, при обработке систокса или его изомера перекисью водорода образуется сульфоксид, а при воздействии перманганатом калия получается сульфон (Fukuto, 1955). Значительно сложнее обстоит вопрос с окислением шрадана (ОМПА).

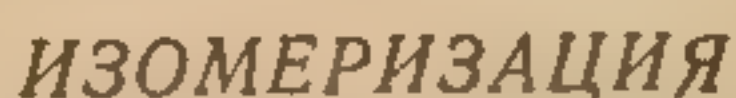




—СН—СОС—  
и, кислота  
алатно, а  
ей в его



ридная сера  
некстнаде  
екисю ват  
рманганг  
ельно слух



ридная сера  
некстнаде  
екисю ват  
рманганг  
ельно слух



ридная сера  
некстнаде  
екисю ват  
рманганг  
ельно слух

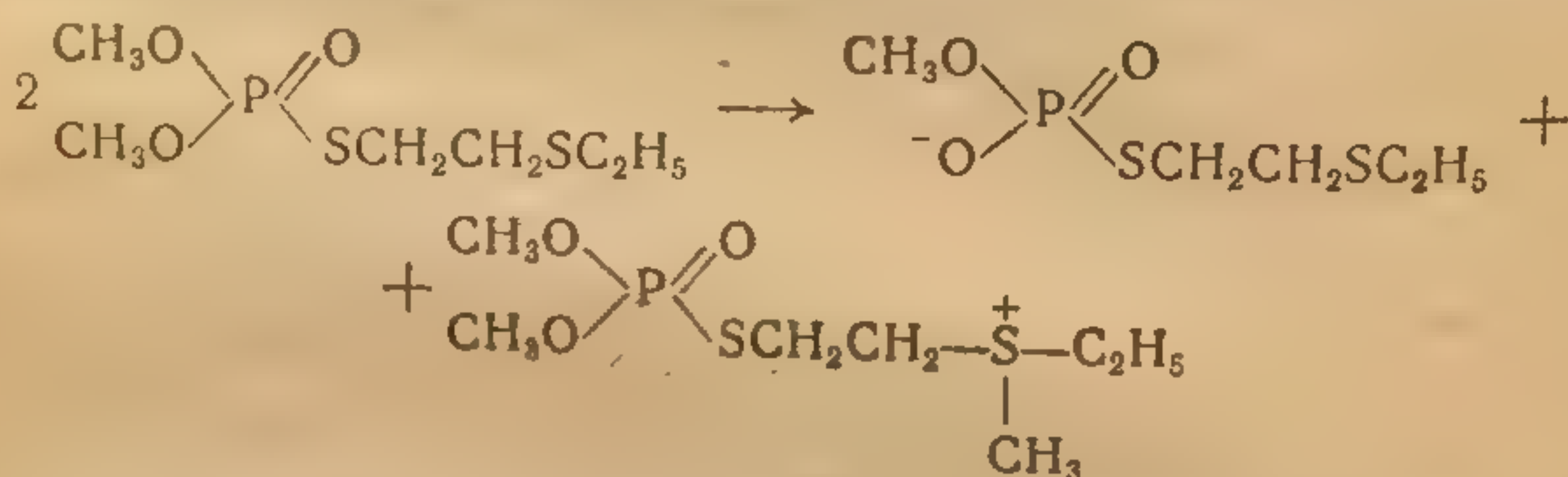


их гидролизуемость и резко возрастает антихолинэстеразная активность. Подробные данные об особенностях протекания тион-тиольной изомеризации у разных ФОС содержатся в монографии О'Брайна (O'Brien, 1960).

В соединениях, содержащих в углеродной цепи двойную связь, возможна цис-транс-изомерия, зависящая от различного расположения групп вокруг двойной связи. Среди ФОС к такого рода соединениям относятся фосдрин, фосфамидон и некоторые другие. Количество того или иного изомера в каждом препарате зависит в большой степени от метода синтеза. Однако и в готовом продукте возможен спонтанный переход одной формы в другую. Так, ультрафиолетовое облучение любой смеси изомеров фосдрина в конце концов дает смесь, в которой содержится 30% цис-формы (Casida, 1955). Цис-изомер фосдрина оказался менее полярным и менее устойчивым к воздействию щелочи, чем транс-изомер.

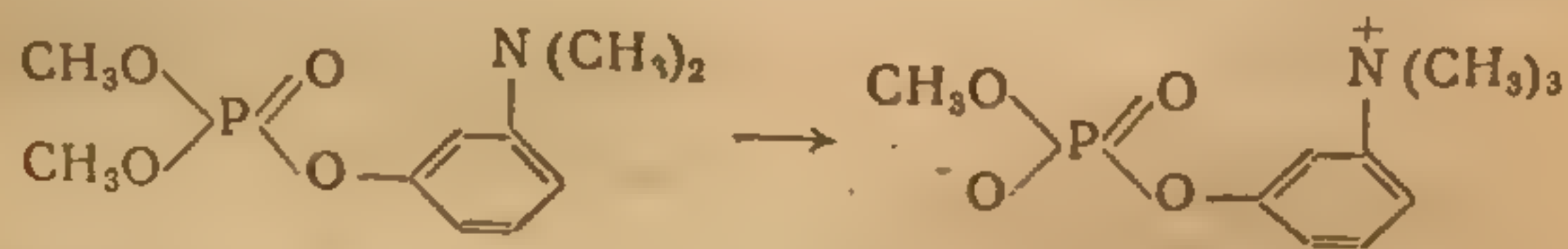
### САМОАЛКИЛИРОВАНИЕ

Некоторые ФОС, содержащие сульфидную серу, как в водном растворе, так и при хранении в чистом виде могут подвергаться своеобразной реакции, при которой одна молекула вещества алкилирует другую, превращая ее в сульфониевое производное (Heath, Vandekar, 1957):



Это превращение резко повышает токсичность и антихолинэстеразную активность соединения.

Некоторые соединения, содержащие третичный азот, тоже способны подвергаться внутримолекулярному самоалкилированию (Ketelaar, 1950):



Рассмотренные в этом разделе химические реакции, в которые способны вступать ФОС, существенно важны для понимания механизма биологических и токсикологических эффектов этих соединений. Как будет показано ниже, реакция фосфорилирования лежит в основе важнейшего биологического свойства



ФОС — их способности подавлять активность холинэстеразы. Многие из описанных реакций (окисление, изомеризация, гидролиз и др.) не только протекают при попадании ФОС в организм животных и человека, но и значительно ускоряются под действием тканевых ферментных систем. В результате наступающих при этом превращений антихолинэстеразные и токсические свойства ФОС могут как ослабляться, так и усиливаться. Достаточно полное знание природы этих превращений совершенно необходимо для правильной оценки судьбы ФОС в организме и для разработки методов профилактики и терапии отравлений ФОС.

### ДЕЙСТВИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФЕРМЕНТЫ

Большое значение для понимания механизма действия ФОС имеет характеристика их влияния на ферментные системы организма. Прежде всего необходимо остановиться на антихолинэстеразном действии, присущем всем ФОС и являющемуся наиболее характерным проявлением их биологической активности.

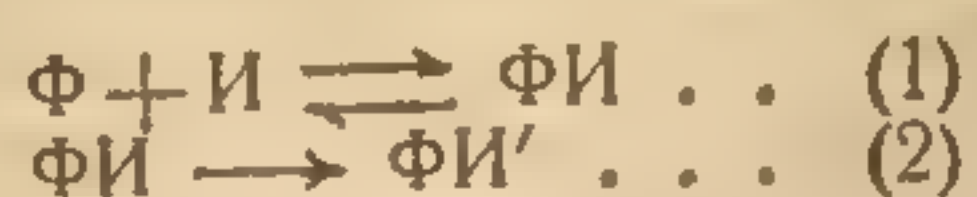
#### ДЕЙСТВИЕ НА ХОЛИНЭСТЕРАЗУ

В настоящее время можно считать установленным, что между фосфорорганическими веществами и холинэстеразой имеет место химическое взаимодействие, основанное на стехиометрических отношениях. Это вытекает прежде всего из определения температурного коэффициента реакции. Нахманзон и др. (Nachmansohn et al., 1948) показали, что по величине этого коэффициента процесс инактивирования высокоочищенной холинэстеразы электрического органа рыб ДФФ не отличается от обычных химических реакций. О наличии стехиометрической реакции свидетельствуют также кинетические измерения, которые показали, что между степенью торможения фермента и концентрацией ингибитора существует линейная зависимость (Brauer, 1948; Nachmansohn et al., 1948; Berry, 1950).

Олдридж (Aldridge, 1950) подробно исследовал кинетику ингибирования холинэстеразы фосфаколом и паратионом и показал, что этот процесс протекает по типу бимолекулярной реакции. Однако в опытах с 8-хинолилдиэтилтиофосфатом картина получалась более сложной: быстрое начальное падение активности после прибавления ингибитора сменялось затем более постепенным снижением, скорость которого не зависела от концентрации ингибитора. Олдридж пришел к заключению, что процесс взаимодействия холинэстеразы с ядом протекает в две фазы. В первой фазе происходит обратимая реакция соединения фермента с ингибитором, в результате которой образуется диссоциирующий комплекс. Это бимолекулярная реакция. Вторая



фаза — мономолекулярное превращение образовавшегося нестойкого комплекса в стабильный:



По мнению Олдриджа, в случае взаимодействия с ферментом фосфакола и паратиона реакция (2) протекает столь быстро, что невозможно обнаружить двухфазность процесса и показать наличие обратимой реакции в первой фазе.

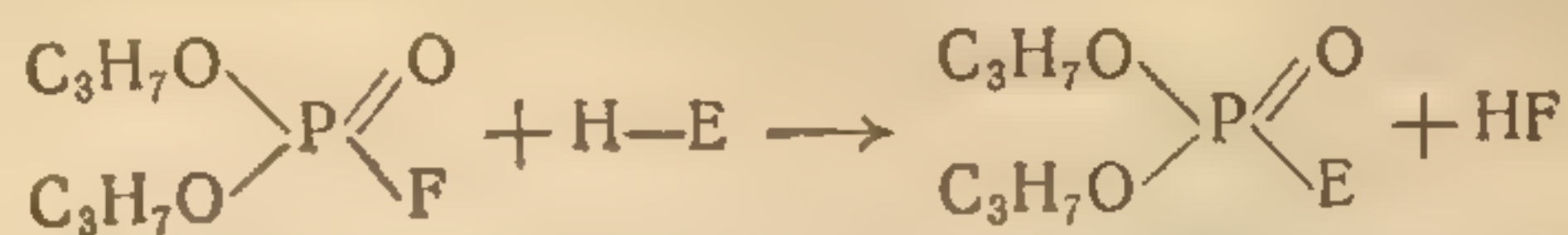
Бимолекулярный характер реакции между ФОС и чувствительными к ним ферментами был подтвержден Яндорфом (Jandorf, 1956) на примере изучения кинетики торможения холинэстеразы различного происхождения и химотрипсина заринном, ДФФ, ТЭПФ и ди-н-пропил-2,2-дихлорвинилфосфатом.

В дальнейшем, главным образом благодаря применению фосфорорганических соединений, меченных радиоактивным фосфором, сложилось представление, что антихолинэстеразное действие ФОС обусловлено подвижностью фосфорангидридной связи в их молекуле и в основе инактивации холинэстеразы лежит реакция ацилирования, в результате которой к ферменту присоединяется фосфорсодержащая часть яда. Так, Боурснелл и Уэбб (Bourisnell, Webb, 1949) в опытах с ДФФ, содержащим радиоактивный фосфор, показали, что после обработки ядом очищенной холинэстеразы лошадиной сыворотки и очищенной эстеразы печени радиоактивность обнаруживается в белковом осадке. Если воздействию ДФФ подвергнуть эстеразу, инактивированную нагреванием, или старую лошадиную сыворотку, лишенную ферментативной активности, то осадок белка не содержит  $P^{32}$ . Мичел и Кроп (Michel, Krop, 1951) изучали взаимодействие радиоактивного ДФФ с высокоочищенной холинэстеразой электрического органа и показали, что присоединение  $P^{32}$  к ферментному белку идет пропорционально степени торможения холинэстеразной активности. Количество связанного с белком радиоактивного фосфора не меняется существенно после отмывания или продолжительного диализа, что свидетельствует о прочности образовавшейся связи.

Весьма обстоятельные данные о механизме взаимодействия ДФФ с ферментами были получены при изучении влияния этого яда на биокаталитическую активность трипсина и химотрипсина. Удалось приготовить кристаллический препарат неактивного химотрипсина после обработки активного фермента ДФФ. Оказалось, что полученный неактивный белок по физическим свойствам идентичен активному химотрипсину (Jansen et al., 1949). В опытах с ДФФ, меченным радиоактивным фосфором, было установлено, что  $P^{32}$  присоединяется к ферментному белку. На основании детальных экспериментальных данных Янсен и др. (Jansen et al., 1950) предложили схему взаимодействия



ДФФ с химотрипсином, согласно которой ДФФ реагирует с молекулой энзима по подвижному водороду, в результате чего выделяется молекула фтористоводородной кислоты, а фосфорсодержащий остаток ДФФ присоединяется к ферментному белку:

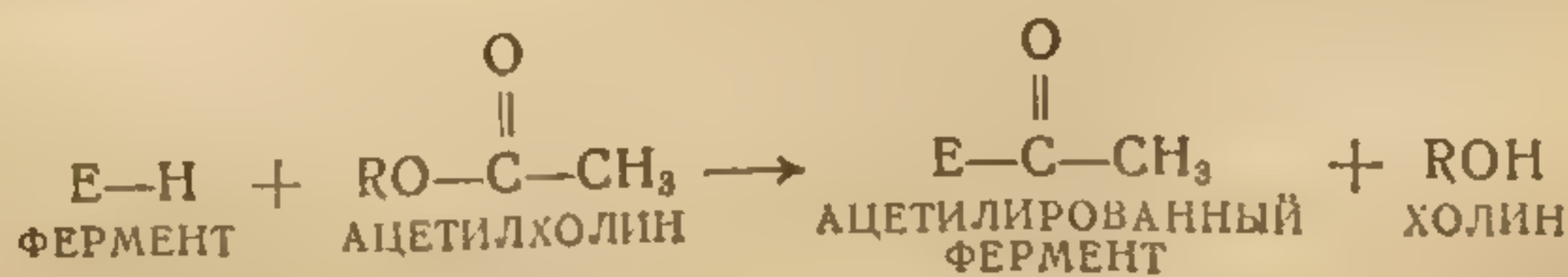


В дальнейшем Янсен и др. (Jansen et al., 1951, 1952) подтвердили свои данные анализом кристаллического неактивного белка, полученного после обработки химотрипсина рядом аналогов ДФФ. Им удалось показать, что, несмотря на большое различие в количестве вещества, необходимом для полного угнетения биокаталитической активности, в каждом случае на 1 моль белка приходится 1 моль фосфора.

В более поздних исследованиях (Hobbiger, 1954; Aldridge, Dawison, 1953) изучалась прочность комплексов фермент — ингибитор, полученных после взаимодействия холинэстеразы с различными фосфорорганическими веществами. При этом были выбраны такие соединения, которые отличались друг от друга только электроотрицательной группой, соединенной с атомом фосфора ангидридной связью, в то время как алкилфосфатный остаток молекулы был во всех случаях одинаковым. Ингибирующая активность исследованных веществ по отношению к холинэстеразе и скорость взаимодействия с ней были различными, но прочность полученных комплексов оказалась одинаковой для всех соединений. Это могло явиться результатом только того, что структура комплексов была одинаковой и, следовательно, к молекуле фермента во всех случаях присоединился алкилфосфатный остаток молекулы яда.

Таким образом, к настоящему времени можно считать твердо установленным, что инактивация фосфорорганическими соединениями чувствительных к ним ферментов состоит в фосфорилировании молекулы фермента этими соединениями. Можно думать, что взаимодействие ФОС с ферментами, например с холинэстеразой, происходит по схеме, аналогичной той, по которой осуществляется основная функция холинэстеразы — гидролиз ацетилхолина.

Взаимодействие холинэстеразы с ацетилхолином было подробно разобрано выше. Как мы видели, это взаимодействие начинается с образования комплекса фермент — субстрат, схематически изображенного на рис. 7. Затем происходит ацетилирование фермента:





При этом отщепляется холин и образуется нестойкий ацетилированный фермент, который быстро подвергается спонтанному гидролизу с образованием уксусной кислоты и исходного активного фермента.

Совершенно аналогично протекает реакция между холинэстеразой и фосфорорганическим ингибитором, например ДФФ.

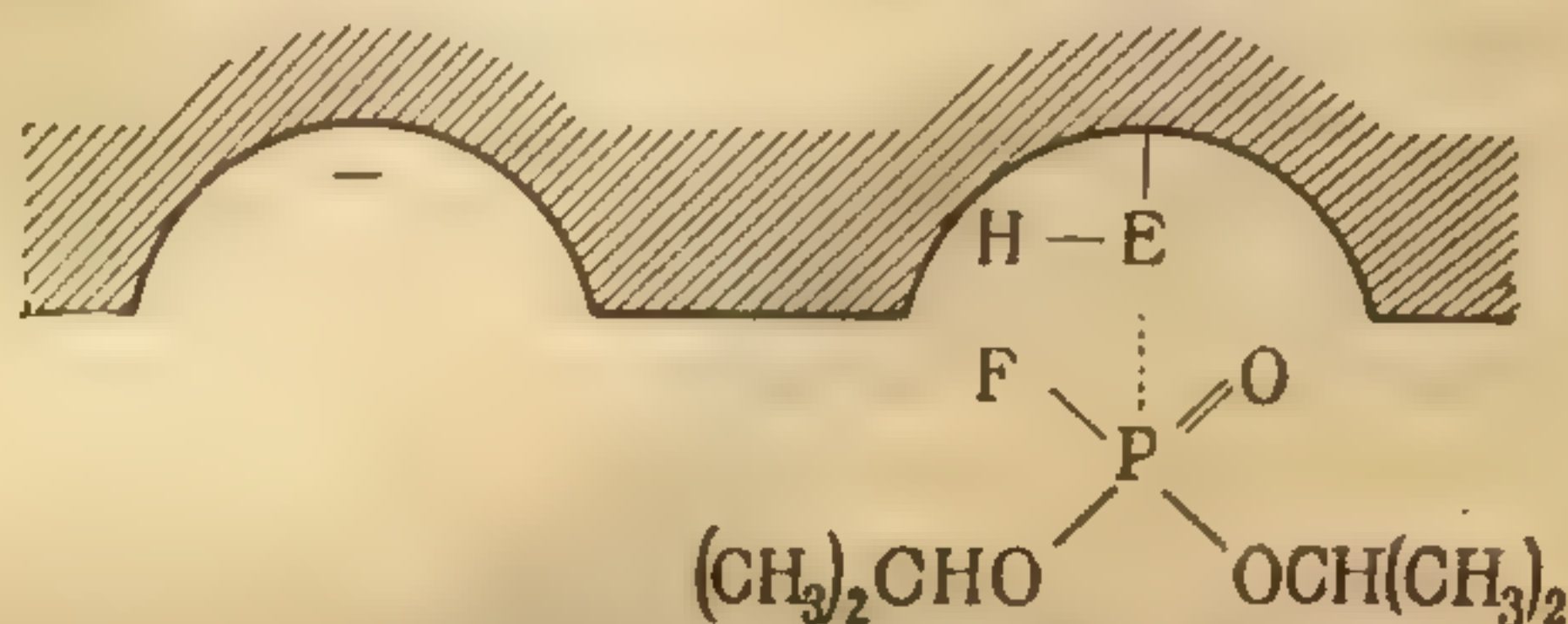
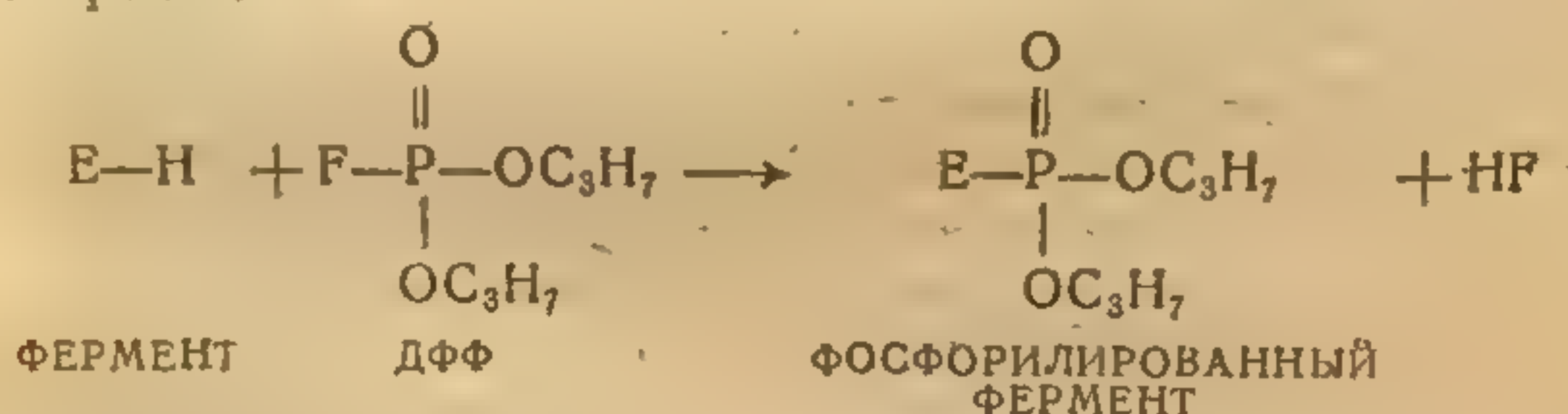


Рис. 13. Схема комплекса холинэстеразы с диизо-пропилфторфосфатом.

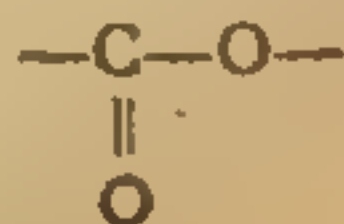
И здесь сначала образуется комплекс, схема которого представлена на рис. 13. В дальнейшем происходит фосфорилирование холинэстеразы:



Фосфорилированный фермент, который образуется при этом, в отличие от ацетилированного фермента, получающегося при гидролизе ацетилхолина, весьма стоек. Он не подвергается разрушению под действием воды и не освобождает исходного фермента. В этом и состоит причина инактивации холинэстеразы под влиянием ФОС.

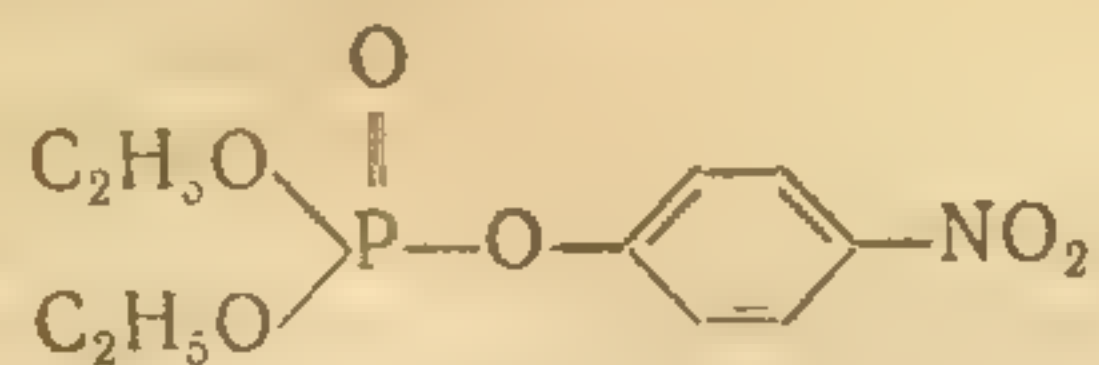
Из рассмотрения приведенных схем видно, что взаимодействие холинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами протекает по такому же плану, как реакция фермента с субстратом его действия — ацетилхолином. Эта аналогия станет еще выраженнее, если сопоставить влияние незначительных изменений строения молекулы субстрата и яда на протекание их реакции с ферментом.

В молекуле ацетилхолина центральная группировка атомов, ответственная за связь с эстеразным центром фермента, может быть изображена следующим образом:

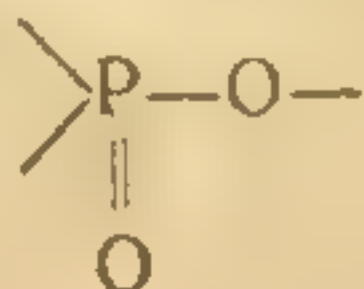




В молекуле типичного фосфорорганического ингибитора, каким является, например, фосфакол:



аналогичная группировка имеет следующий вид:

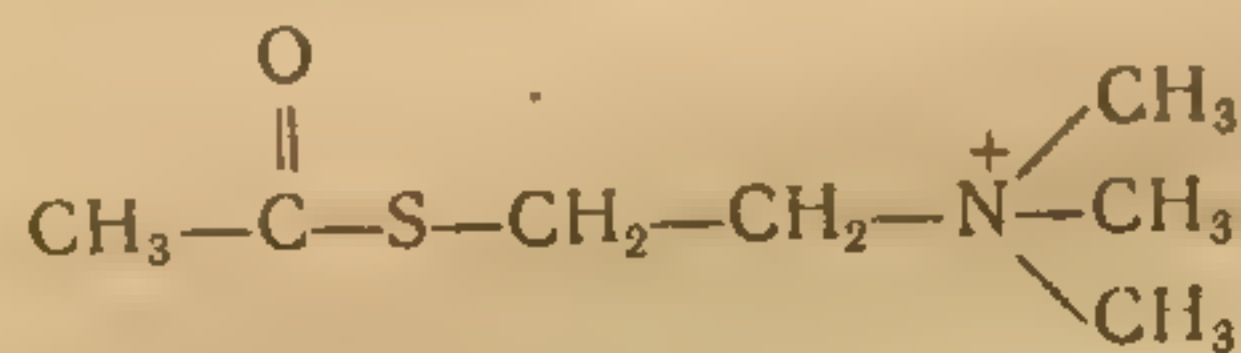


Были предприняты попытки изменить строение центральных атомных группировок субстрата и ингибитора путем замены кислорода, находящегося в разном положении, на серу.

Эти изменения в ряде случаев существенно влияли на реакционную способность соединений по отношению к холинэстеразе. Так, оказалось, что замена эфирного кислорода в молекуле ацетилхолина на серу, г. е. образование тиолового эфира — ацетилтиохолина, имеющего группировку



изменяет его способности подвергаться каталитическому гидролизу под действием холинэстеразы.

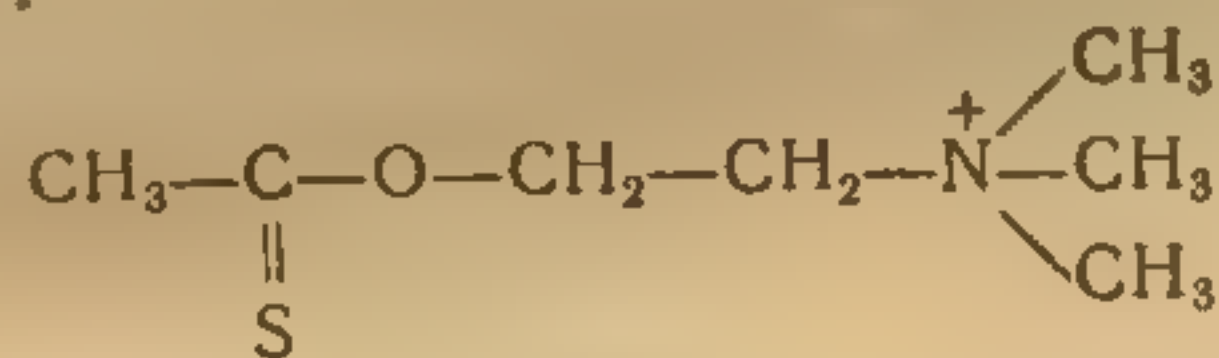


АЦЕТИЛТИОХОЛИН

В то же время изомерный ацетилтихолину тионовый эфир (I), содержащий группировку



живым к действию холинэстеразы разного происхождения (Bergmann et al., 1958).



I

Такие же отношения установлены для тио-аналогов фосфакола. Оба его тиоловых аналога (II и III), содержащих группировки

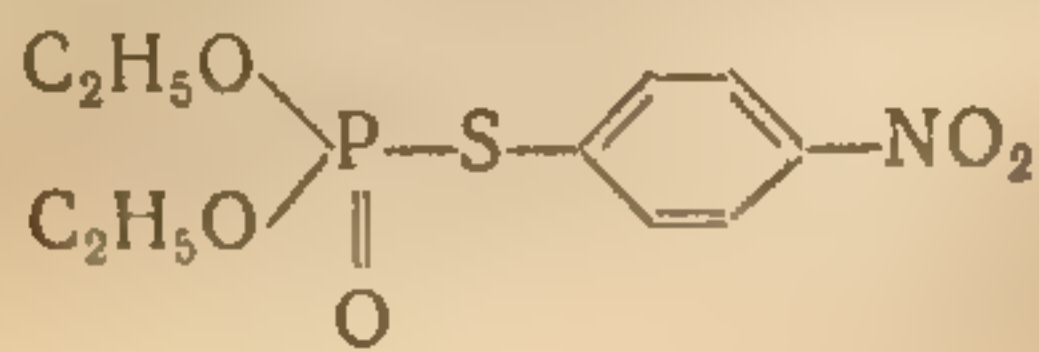


тивность фермента (Diggle a. Gage, 1951), тогда как изомерный

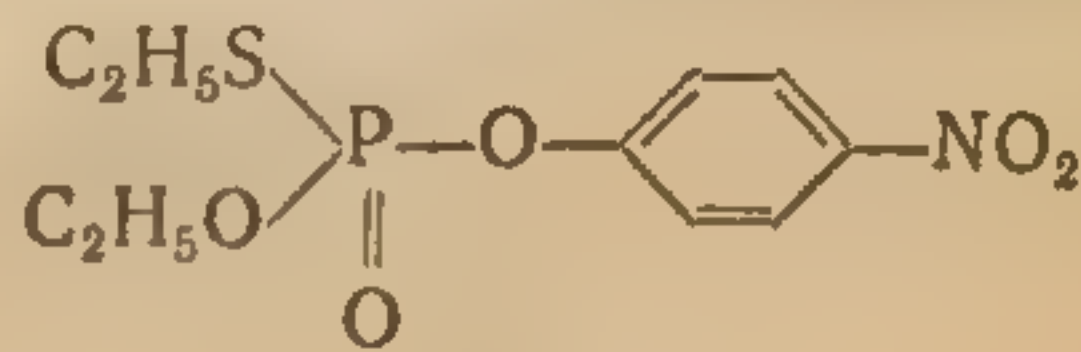


им паратион с центральной группировкой  $\begin{array}{c} >P-O- \\ || \\ S \end{array}$  в чистом

виде совершенно лишен антихолинэстеразной активности. Попав в организм животных, паратион подвергается ферментативному окислению в фосфакол или изомеризации с образованием

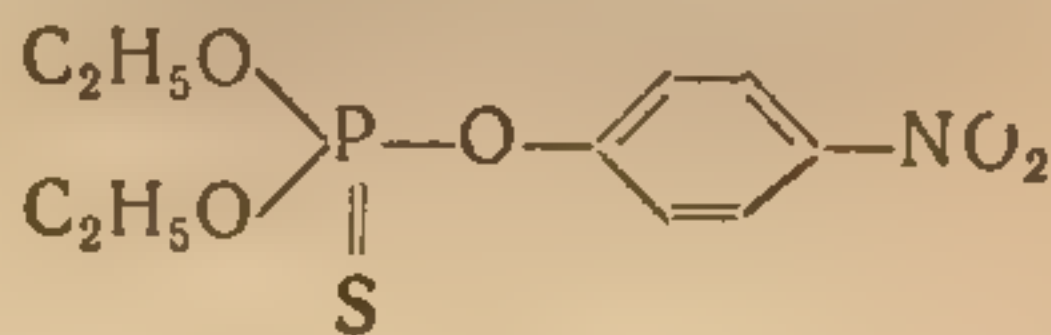


II



III

II или III и благодаря этому приобретает антихолинэстеразные, а вместе с тем и токсические свойства (Gage, 1953; Kilby, 1954).



ПАРАТИОН

Изложенные данные о влиянии строения центральной атомной группировки субстрата и ингибитора на их способность взаимодействовать с холинэстеразой суммированы в табл. 10.

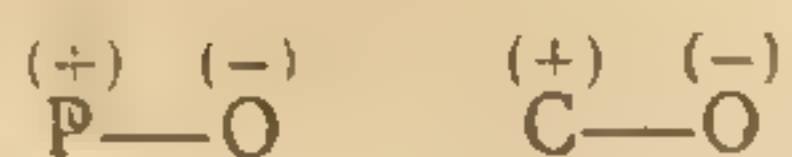
Таблица 10

Субстрат	Ингибитор
$\begin{array}{c} -C-O- \text{ гидролизуется} \\    \\ O \end{array}$	$\begin{array}{c} >P-O- \text{ тормозит} \\    \\ O \end{array}$
$\begin{array}{c} -C-S- \text{ гидролизуется} \\    \\ O \end{array}$	$\begin{array}{c} >P-S- \text{ тормозит} \\    \\ O \end{array}$
$\begin{array}{c} -C-O- \text{ не гидролизуется} \\    \\ S \end{array}$	$\begin{array}{c} >P-O- \text{ не тормозит} \\    \\ S \end{array}$

Из таблицы совершенно отчетливо видно, что для осуществления реакции между субстратом или ингибитором с холинэстеразой необходимо наличие группировки  $C=O$  или  $P=O$  соответственно. Замена кислорода в этой группе на серу лишает вещества их способности реагировать с ферментом. Проще всего это явление можно объяснить тем, что для реакции с



ферментом необходимо, чтобы реагирующая группа была поляризована:



Тогда атом фосфора или углерода, приобретающий некоторый положительный заряд, становится способным вступить в реакцию с электроотрицательной (нуклеофильной) группой эстеразного центра холинэстеразы. Подобного рода поляризация, как известно, осуществляется за счет оттяжки электронов кислородом и создания в результате этого электронного пробела (избытка положительного заряда) при атоме углерода или фосфора. Сера практически лишена способности воспринимать электроны, и поэтому поляризация  $\text{P}=\text{S}$  или  $\text{C}=\text{S}$  связи не происходит.

#### Кинетика торможения холинэстеразы и способ выражения антихолинэстеразной активности ФОС

Выше уже отмечалось, что взаимодействие между холинэстеразой и ФОС протекает по кинетике бимолекулярной реакции. В случае избытка ингибитора константа скорости этой реакции может быть выражена уравнением:

$$k_2 = \frac{1}{t[I]} \cdot \ln \left( \frac{a}{a-x} \right),$$

где  $k_2$  — бимолекулярная константа скорости;  $[I]$  — молярная концентрация ингибитора;  $a$  — начальная активность фермента;  $x$  — активность фермента после инкубации с ингибитором в течение  $t$  минут. Величину  $\frac{a}{a-x}$  можно рассматривать как отношение исходной активности фермента к его остаточной активности в момент  $t$ . Активность фермента практически удобно выражать в процентах, и тогда величина  $\frac{a}{a-x}$  принимает вид  $\frac{100}{P}$ , где  $P$  — % активности фермента ко времени  $t$ . Подставив это выражение и переведя натуральные логарифмы в десятичные, получаем:

$$k_2 = \frac{2,303}{t[I]} \cdot \log \left( \frac{100}{P} \right).$$

Решение этого уравнения для  $\log P$  дает

$$\log P = 2 - \left( \frac{k_2[I]}{2,303} t \right).$$

Из этого следует, что зависимость  $\log P$  от времени при всех концентрациях ингибитора должна быть прямолинейна. Олдридж и Дэйвисон (Aldridge, Davison, 1952) подтвердили пра-



вильность этого положения на примере холинэстеразы эритроцитов, угнетенной диэтил-п-хлорфенилфосфатом (рис. 14).

Подобного же рода кинетика оказалась характерной для угнетения ложной и истинной холинэстеразы многими ФОС (В. А. Яковлев и Р. И. Волкова, 1959; С. М. Марков и др., 1961; В. А. Яковлев, 1962; Aldridge, 1950, 1953; Aldridge a. Davison, 1952a, б; Davison, 1955; Jandorf, 1956, и др.).

Немногочисленные имеющиеся в литературе данные о не-  
соответствии реакции угнетения холинэстеразы описанной выше  
кинетике псевдопервого порядка могут быть без труда объяс-  
нены в каждом отдельном случае.

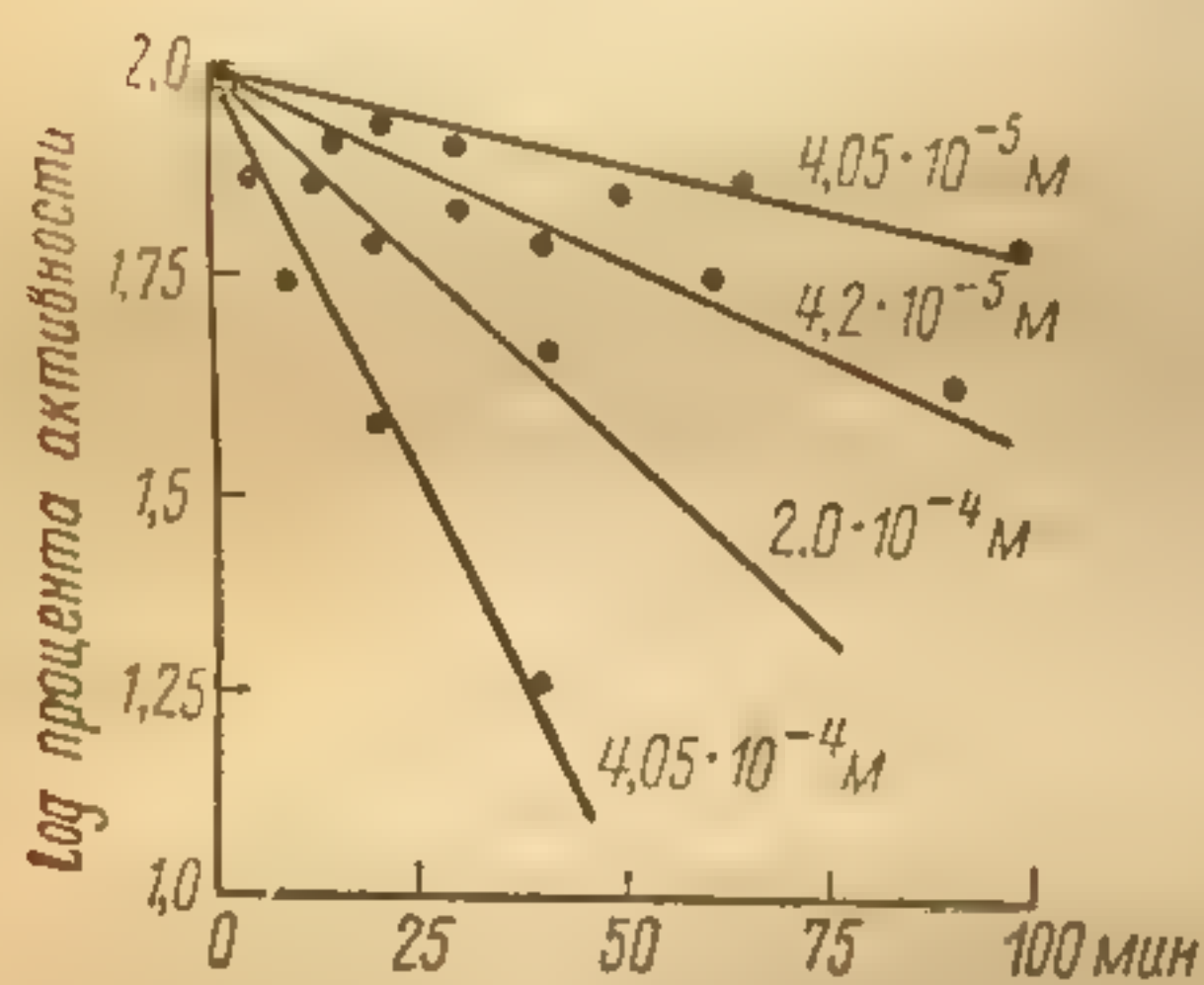


Рис. 14. Скорость угнетения холинэстеразы эритроцитов диэтилхлорфенилфосфатом (Aldridge, Davison, 1952).

ки антихолинэстеразной активности ФОС, пригодный для сравнительных исследований, состоит в определении бимолекулярной константы скорости реакции угнетения, которая имеет размерность  $л/моль \cdot мин$  и, следовательно, учитывает как концентрацию ингибитора, так и продолжительность его взаимодействия с ферментом. Сравнительно простой и надежный способ определения величины этой константы описан В. А. Яковлевым и Р. И. Волковой (1959). В случае взаимодействия с ферментом ФОС, обладающих выраженным антихолинэстеразным действием, скорость их реакции с холинэстеразой чрезвычайно велика. По данным В. А. Яковлева и Р. И. Волковой (1962), торможение холинэстеразы бычьих эритроцитов препаратом Гд-42 (метилсульфометилат О-этил-S-β-этилтиоэтилового эфира метилтиофосфиновой кислоты) имеет константу скорости, равную  $3,5 \cdot 10^7 л/моль \cdot мин$ ; для холинэстеразы сыворотки крови эта константа составляет  $1,45 \cdot 10^6 л/моль \cdot мин$ .

Вместе с тем, такой способ выражения антихолинэстеразной активности имеет очень ограниченное распространение. В подавляющем большинстве работ, как отечественных, так и зару-

З. Ж. Б. Х. Д. Т. Х. С.  
ФОС и других и.  
Из которой пред.  
битора, необходи.  
30%. Нередко эту  
ениях, а в виде «  
отрицательному :

Некоторые ис-  
лев, 1962) катего-  
личины 150 для  
сти ФОС. При эт  
ображений о том  
количество молек  
активных центро  
реакции до конца  
жны иметь одина  
наковое количест

Нам представ  
чтобы быть отве  
соображения пр  
альные» условия  
ции ингибитора  
длительную инку  
форилирования.  
даются: ингибит  
реакции обычно  
Серьезным недо  
учитывает факт  
во всех случаях  
том одно и то ж  
но характеризов  
станта скорости  
численно связан  
Из приведен

видно, что если  
можно обознач

Другими словами можно вычислить опытов в сопоставлении всегда имеется п

8 С. Н. Голяков



бежных, для характеристики антихолинэстеразного действия ФОС и других ингибиторов холинэстеразы используют величину  $I_{50}$ , которая представляет собой молярную концентрацию ингибитора, необходимую для угнетения активности фермента на 50%. Нередко эту величину выражают не в абсолютных значениях, а в виде «показателя угнетения»  $pI_{50}$ , численно равного отрицательному логарифму самой величины

$$pI_{50} = -\log I_{50}.$$

Некоторые исследователи (Jandorf et al., 1955; В. А. Яковлев, 1962) категорически возражают против использования величины  $I_{50}$  для характеристики антихолинэстеразной активности ФОС. При этом они исходят из, в общем, правильных соображений о том, что эта величина фактически отражает лишь количество молекул ФОС, пошедших на реакцию с половиной активных центров фермента. Следовательно, при доведении реакции до конца все необратимые ингибиторы типа ФОС должны иметь одинаковую величину  $I_{50}$ , если в опыт берется одинаковое количество фермента.

Нам представляется, что величина  $I_{50}$  не заслуживает того, чтобы быть отвергнутой столь решительно. Приведенные выше соображения противников этой величины предполагают «идеальные» условия протекания реакции, т. е. равные концентрации ингибитора и фермента (в молярном выражении) и очень длительную инкубацию при отсутствии побочных реакций фосфорилирования. Фактически такие условия никогда не соблюдаются: ингибитор всегда берется в большом избытке, а время реакции обычно ограничивается немногими десятками минут. Серьезным недостатком величины  $I_{50}$  является то, что она не учитывает фактора времени. Если же ввести этот фактор или во всех случаях продолжать инкубацию ингибитора с ферментом одно и то же время, то величина  $I_{50}$  будет столь же надежно характеризовать антихолинэстеразную активность, как и константа скорости. Легко убедиться в том, что эти две величины численно связаны друг с другом.

Из приведенного уравнения

$$k_2 = \frac{2,303}{t[I]} \cdot \log \left( \frac{100}{P} \right)$$

видно, что если  $P = 50$ , т. е. фермент угнетен на 50%, то  $[I]$  можно обозначить как  $I_{50}$ . Подставив эти значения, получаем:

$$k_2 = \frac{2,303}{t \cdot I_{50}} \cdot \log \left( \frac{100}{50} \right) = \frac{0,695}{t \cdot I_{50}}.$$

Другими словами, зная время инкубации, по величине  $I_{50}$  всегда можно вычислить  $k_2$ , и наоборот. Поэтому при проведении опытов в сопоставимых условиях между величинами  $I_{50}$  и  $k_2$  всегда имеется полное соответствие (см., например, Aspregen, 1960)



## Зависимость между структурой ФОС и их антихолинэстеразной активностью

Способность ФОС угнетать активность холинэстеразы зависит от нескольких факторов. Поскольку в конечном счете при реакции холинэстеразы с ФОС образуется стойкий фосфорилированный фермент, нужно думать, что фосфорилирующая способность ФОС в значительной мере определяет их антихолинэстеразную активность. Но прежде чем произойдет реакция фосфорилирования, нужно, чтобы молекула ФОС достаточно близко подошла к активной поверхности фермента, вступила бы с нею в тесный контакт. Иными словами, для образования комплекса между ферментом и ингибитором нужно, чтобы молекула ингибитора была определенным образом ориентирована на поверхности фермента, чтобы она составила своеобразное «молекулярное дополнение» к этой поверхности или, как говорят, обладала необходимой «молекулярной комплементарностью».

Два названных фактора: фосфорилирующая способность и способность к определенной ориентации (молекулярная комплементарность) — являются главными в определении антихолинэстеразной активности ФОС. Однако конечный эффект — степень подавления холинэстеразного действия — зависит не только от этих факторов. Важную роль играет, например, прочность фосфорилированного производного фермента, его способность разрушаться под действием воды, скорость протекания различных побочных реакций, в которые могут вступать ФОС и др.

### Фосфорилирующая способность

Выше уже отмечалось, что взаимодействие между ФОС и холинэстеразой осуществляется путем электрофильной атаки атома фосфора на нуклеофильную группу — гидроксил серина в эстеразном центре фермента. Для того, чтобы обеспечить возможность такой атаки, атом фосфора должен обладать некоторым избытком положительного заряда; и совершенно естественно, что чем больше этот избыток, т. е. чем выше электрофильность фосфора, тем выраженнее должна быть его фосфорилирующая способность.

Пюльман и Вальдеморо (Pullman, Valdemoro, 1960) методом молекулярных орбит рассчитали распределение электронов в молекуле различных ФОС и численно выразили величину положительного заряда при атоме фосфора. Свои результаты они сопоставили с литературными данными об антихолинэстеразной активности. Оказалось, что для таких соединений, как паратион, фосфакол, мипафокс, тетраэтилпирофосфат, диизопропилфторфосфат и др., существует четкий параллелизм между си-

Здесь R и R' —  
ая группа. Со  
каждой из групп,  
электрофильность  
Основные или  
построенных по  
строения, на осн  
что с увеличением  
эстеразная актив  
периментальные  
ние вещей дале  
суждениям. Нек  
групп на антихо  
в табл. 11. Из т  
пов ФОС Суще  
линэстеразной а  
ных радикалов.  
случаях отлича  
(А) и алкилами  
ладают изопро

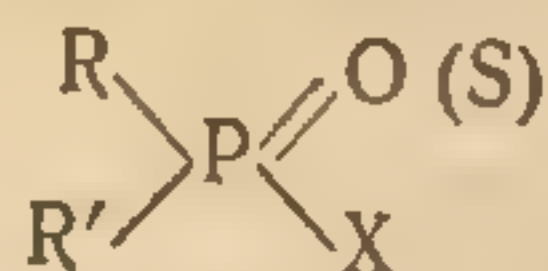
Влияние	
R	(RO) <sub>2</sub> P(O) (A)
CH <sub>3</sub>	7,0
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	8,1
n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	8,25
изо-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	8,9
n-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	8,7
n-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	

\*1 Macworth  
\*2 Brauer, 19  
\*3 Л. С. Афо  
\*4 И. А. Фра



лой антиэстеразного действия и величиной положительного заряда при фосфоре.

Как указано выше, строение любого фосфорорганического ингибитора холинэстеразы можно представить в следующем виде:



Здесь R и R' — основные или нейтральные группы; X — кислотная группа. Совершенно очевидно, что изменение структуры каждой из групп, связанных с фосфором, может повлиять на электрофильность атома фосфора.

**Основные или нейтральные группы.** При рассмотрении ФОС, построенных по типу  $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{X}$  или близких к этому типу строения, на основании электронной теории можно ожидать, что с увеличением размеров алкильных радикалов антихолинэстеразная активность должна убывать. Однако имеющиеся экспериментальные данные показывают, что фактическое положение вещей далеко не всегда соответствует теоретическим рассуждениям. Некоторые данные о влиянии строения алкильных групп на антихолинэстеразную активность ФОС представлены в табл. 11. Из таблицы видно, что для каждого из четырех типов ФОС существует своя закономерность изменения антихолинэстеразной активности в зависимости от структуры алкильных радикалов. Она не совпадает для разных ФОС и во всех случаях отличается от теоретической. В группе фторфосфатов (А) и алкиламидофосфатов (Г) максимальной активностью обладают изопропильные производные, однако на этом сходство

Таблица 11

Влияние структуры алкильных групп на антихолинэстеразную активность ( $\text{pI}_{50}$ )

R	$(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{F}^*1$ (А)	$\text{RO})_2\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{OR})_2^*2$ $\begin{array}{c} \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ (Б)	$\text{R}_2\text{P}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2^*3$ (В)	$(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}^*4$ (Г)
$\text{CH}_3$	7,0	5,7	—	3,0
$\text{C}_2\text{H}_5$	8,1	9,1	7,0	6,0
$n\text{-C}_4\text{H}_9$	8,25	7,6	8,3	5,0
изо- $\text{C}_3\text{H}_7$	8,9	—	6,0	6,6
$n\text{-C}_4\text{H}_9$	—	8,9	9,0	—
изо- $\text{C}_4\text{H}_9$	8,7	—	6,3	4,5

\*1 Macwoth a. Webb, 1948.

\*2 Brauer, 1948.

\*3 Л. С. Афонская и И. В. Заиконникова, 1962.

\*4 И. А. Франков, 1962.



между обеими группами заканчивается. При переходе к изобутильному производному в группе А активность почти не изменилась, тогда как в группе Г она резко упала. В группе А активность постепенно возрастала при переходе от метила к пропилу, в то же время в группе Г активность этильного производного оказалась выше, чем пропильного. Для ФОС, являющихся производными пиродифосфорной кислоты (Б), наиболее эффективным оказался этильный гомолог и н-бутильный лишь немногим уступал ему по активности. В группе п-нитрофениловых эфиров диалкилфосфиновых кислот (В) самой высокой антихолинэстеразной активностью обладало н-бутильное производное, несколько слабее действовало н-пропильное. Разветвление алкильной цепи (переход от н-пропила к изопропилу и от н-бутила к изобутилу) в этой группе соединений сопровождалось резким снижением антихолинэстеразной активности. В отличие от этого в группах А и Г ветвление пропильного радикала приводило к заметному повышению активности. Но главный вывод, который вытекает из рассмотрения табл. 10, состоит в том, что найденные зависимости совершенно не совпадают с теоретическими предположениями, высказанными на основании электронных представлений.

Особенно бросается в глаза низкая активность метильных производных. Эти соединения оказались самыми слабыми ингибиторами холинэстеразы в каждом из рассмотренных рядов. Необычное поведение метильных производных можно предположительно объяснить тем, что они образуют нестойкие продукты фосфорилирования холинэстеразы, благодаря чему угнетенный фермент подвергается сравнительно быстрой спонтанной реактивации (подробнее этот вопрос будет рассмотрен ниже).

Необходимо подчеркнуть, что характер изменения антихолинэстеразной активности с изменением структуры в большой степени зависит от того, какой фермент служит объектом исследования. В случае использования истинной холинэстеразы этильные производные, как правило, оказываются более эффективными ингибиторами, чем изопропильные; для ложной холинэстеразы чаще всего встречаются обратные отношения.

**Кислотная группа.** Группа Х, связанная с фосфором ангидридной связью, отщепляется в ходе фосфорилирования фермента и образует кислоту НХ. Электрофильность группы Х, которая определяет лабильность связи Р—Х, может быть определена различными способами. Наиболее удобными критериями для оценки этого свойства являются сила кислоты НХ и скорость щелочного гидролиза всей молекулы ФОС. Исследования показали, что по обоим этим критериям между электрофильностью группы Х и антихолинэстеразной активностью существует вполне удовлетворительная корреляция. Кетелар (Ketelaar,



1953) сопоставил антихолинэстеразную активность некоторых фениловых эфиров диэтилфосфорной кислоты с величиной  $pK$  отщепляющихся при их гидролизе фенолов. Результаты этого сопоставления представлены в табл. 12.

Из таблицы видно, что уменьшению величины  $pK$  (или, что то же самое — увеличению силы кислоты) соответствует повышение антихолинэстеразных свойств. Правда, это соответствие является лишь качественным, так как в отдельных случаях наблюдаются исключения, но общая тенденция выражена достаточно четко.

Еще лучше коррелирует антихолинэстеразная активность ФОС со скоростью их щелочного гидролиза. Олдридж и Дэйвисон (Aldridge, Davison, 1952a) на примере различных замещенных диэтилфенилфосфатов показали, что между логарифмом константы скорости гидролиза и логарифмом константы скорости угнетения холинэстеразы существует прямолинейная зависимость.

Хорошую зависимость между скоростью гидролиза и силой антиэстеразного действия в ряду алкиловых эфиров тио- и дитиофосфорных кислот обнаружил В. А. Яковлев (1962). В полном соответствии с отмеченной закономерностью находятся данные Л. С. Афонской и И. В. Заиконниковой (1962), которые изучали свойства ароматических эфиров моно- и диэтилфосфиновых кислот. Авторы установили четко выраженное влияние характера и положения заместителя в ароматическом радикале на антихолинэстеразную активность соединений. Замена нитрогруппы на хлор или на метильный радикал приводила к значительному уменьшению активности. Орто- и метаизомеры обладали меньшей активностью, чем параизомеры.

**$P=O$ ,  $P=S$  и другие группы.** Выше уже отмечалось, что группа  $P=S$  обладает значительно меньшей способностью к поляризации, чем группа  $P=O$ , и следовательно, в соединениях, содержащих  $P=S$  группу (в фосфотионатах), положительный заряд при атоме фосфора намного меньше, чем в веществах, имеющих  $P=O$  группу. Поэтому и по антихолинэстеразной активности фосфотионаты значительно уступают соответствующим фосфатам. Как правило, это различие выражено очень резко. Например, паратлон и метилпаратлон являются в 10 000 раз более слабыми ингибиторами холинэстеразы, чем соответствующие им

Таблица 12

Зависимость между антихолинэстеразной активностью соединений типа  $(C_2H_5O)_2P(O)OC_6H_4R$  и значением  $pK$  соответствующих фенолов (Ketelaar, 1953)

R	$pK$ фенола $HO-C_6H_4R$	$PI_{50}$ всего соединения
$p-NH_2$ . . .	10,3	4,0
$H$ . . . . .	9,9	3,5
$p-Cl$ . . . .	9,2	3,4
$o-Cl$ . . . .	8,5	4,2
$o-NO_2$ . . .	7,2	6,5
$p-NO_2$ . . .	7,2	7,7



фосфаты — параоксон (фосфакол) и метилпараоксон (Augustinsson, Jonsson, 1957). Совершенно четкие, хотя и менее выраженные различия между  $P=O$  и  $P=S$  формами отметил В. А. Яковлев (1962) при исследовании этиловых эфиров моно- и дитиофосфорных кислот.

Окисление серы, входящей в состав ФОС, повышает антихолинэстеразные свойства соединений не только в том случае, если этот процесс состоит в превращении группы  $P=S$  в группу  $P=O$ . Фукуто и др. (Fukuto et al., 1955), а также Ю. С. Каган (1961, 1962) исследовали изменения свойств систокса по мере окисления серы, находящейся в составе кислотной группы. Результаты этих исследований, представленные в табл. 13, показывают, что окисление до сульфона приводит к отчетливо выраженному повышению антихолинэстеразных свойств *in vitro*.

Таблица 13

Антихолинэстеразная активность систокса и продуктов его окисления

Вещество	$pl_{50}$	
Систокс $(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2CH_2SC_2H_5$ . . . . .	3,7 *	4,7 **
Сульфоксид $(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2CH_2SC_2H_5$ . . . . .	5,5	4,3
$\begin{array}{c} O \downarrow \\ \uparrow O \end{array}$		
Сульфон $(C_2H_5O)_2P(S)SCH_2CH_2SC_2H_5$ . . . . .	6,1	5,8
$\downarrow$ $O$		

\* Fukuto и др., 1955.

\*\* Ю. С. Каган, 1962.

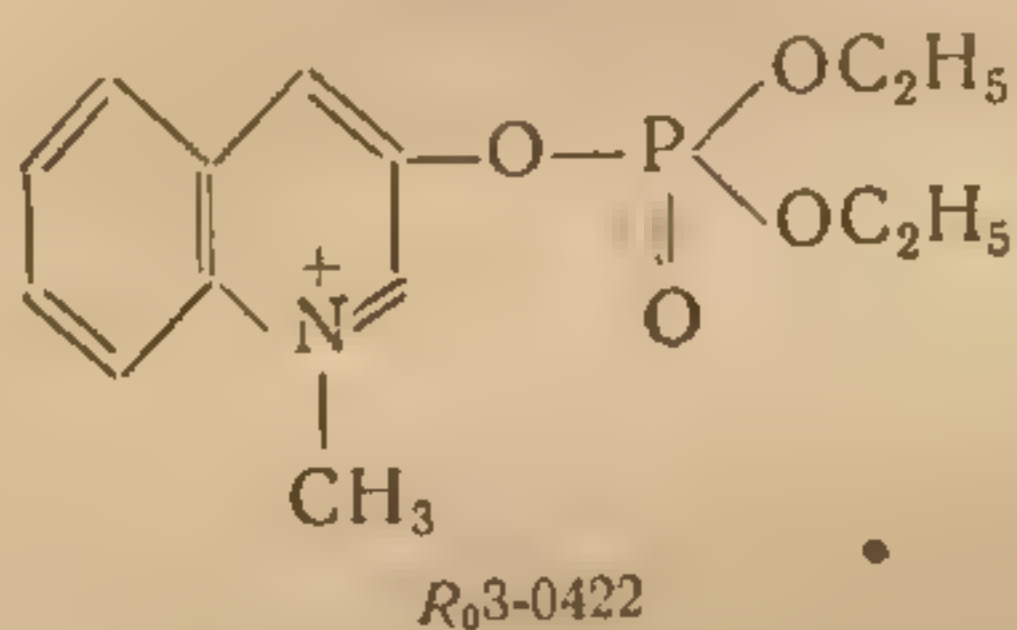
В то же время, как установил Ю. С. Каган, способность подавлять активность холинэстеразы при введении веществ животным, а также токсичность соединений падают при переходе от систокса к его сульфону. В отличие от Фукуто, Ю. С. Каган показал, что промежуточное соединение — сульфоксид — обладает несколько менее выраженным антихолинэстеразным действием, чем исходный систокс. Несколько иные данные получили И. Л. Брик и В. А. Яковлев (1962а). Они исследовали действие этих соединений на холинэстеразу голов мух и мозга мышей и в качестве критерия антихолинэстеразной активности определяли величину бимолекулярной константы скорости угнетения фермента. Оказалось, что сульфоксид и сульфон не отличаются друг от друга по антиэстеразному действию, но оба они являются более эффективными ингибиторами, чем исходный сис-



токс. Найденные факты авторы объясняют тем, что окисление атома серы до сульфоксида усиливает индукционный эффект и повышает формальный положительный заряд на атоме фосфора. Дальнейшее окисление до сульфона не изменяет реакционную способность вещества, поскольку вторая связь  $S=O$  не является семиполярной.

### Способность к ориентации

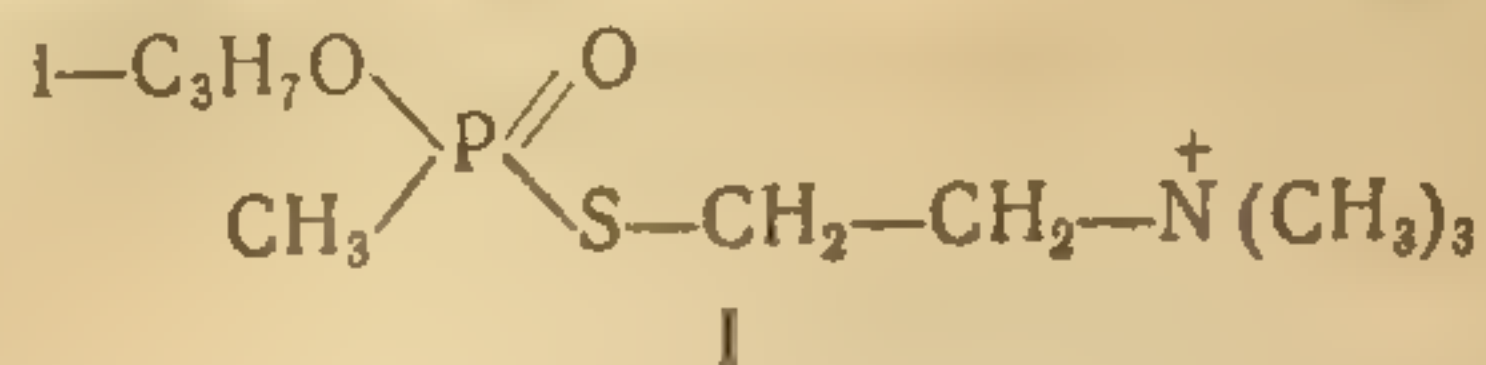
Реакция взаимодействия фосфорорганических ингибиторов с холинэстеразой состоит в фосфорилировании остатка серина в эстеразном центре. По существу, анионный центр в этой реакции не участвует. В то же время известно, какую важную роль играет анионный центр в каталитическом действии холинэстеразы; он электростатически притягивает катионную головку ацетилхолина и обеспечивает тем самым необходимую ориентацию молекулы субстрата на активной поверхности фермента. Совершенно очевидно, что введение катионной головки в молекулу ФОС тоже должно улучшить ориентацию ингибитора на активной поверхности фермента и тем самым повысить антихолинэстеразную эффективность ингибитора. Проще всего создать такую катионную головку введением в молекулу ингибитора положительно заряженного атома азота. Такую попытку еще в 1954 г. предпринял Хоббигер (Hobbiger, 1954). Он исследовал действие на холинэстеразу двух ФОС ( $R_03-0422$ ) (N-метилхинолинийдиэтилфосфат) и его третичного аналога.



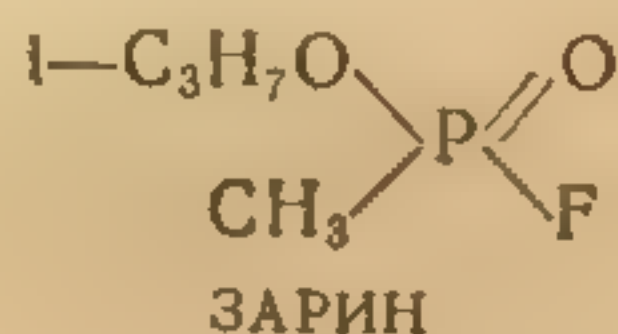
Как и следовало ожидать, четвертичное соединение оказалось значительно (в 270 раз) более эффективным ингибитором холинэстеразы, чем третичное. В дальнейшем было синтезировано и изучено большое число ФОС, содержащих азот. Среди них наибольший интерес представляют производные холина (Tammelin, 1957, 1958a, б). ФОС этого типа должны быть разбиты на две группы, принципиально отличающиеся по строению друг от друга. В одной группе остаток холина или, чаще, тиохолина представляет собой кислотную группировку X в общей формуле строения ФОС (см. стр. 115), т. е. такую группировку, которая отщепляется в реакции фосфорилирования и замещается на остаток серина, принадлежащий эстеразному центру



фермента. Типичным представителем ФОС этой группы может служить, например, метилизопропоксифосфорилтиохолин (I).

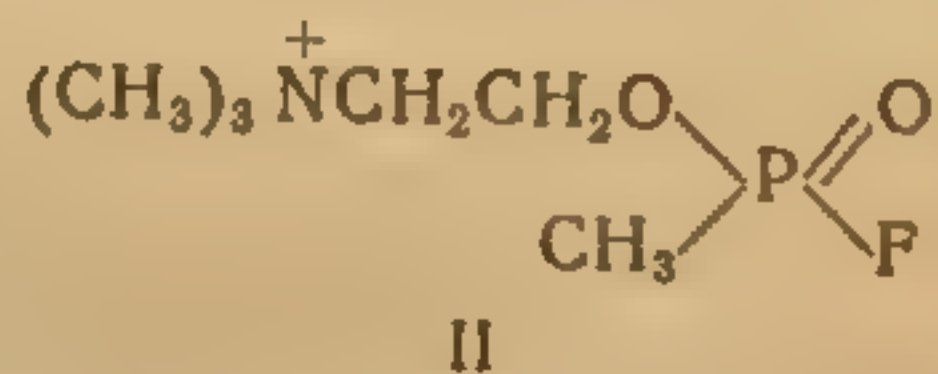


При взаимодействии этого и подобных ему соединений с холинэстеразой остаток тиохолина играет двойную роль: на первом этапе (при образовании комплекса фермент — ингибитор) этот остаток выполняет функцию «якоря», который притягивается анионным центром фермента и этим способствует сближению ингибитора с ферментом. На втором этапе он отщепляется, и по освободившейся связи фосфорильный остаток присоединяется к эстеразному центру. Таммелин (Tammelin, 1958a) прямыми опытами показал, что при взаимодействии холинэстеразы с изображенным выше соединением I образуется точно такой же продукт фосфорилирования, как и при реакции фермента с зарин, у которого фосфорильный остаток построен так же, как у I, но кислотная группа представляет собой не тиохолин, а фтор:



Фосфохолины описанного типа обладают выраженным антихолинэстеразным действием, однако не имеют существенных преимуществ перед другими эффективными ФОС. Например, соединение I имеет точно такую антихолинэстеразную активность, как и зарин ( $\text{pI}_{50} = 8,6$ ).

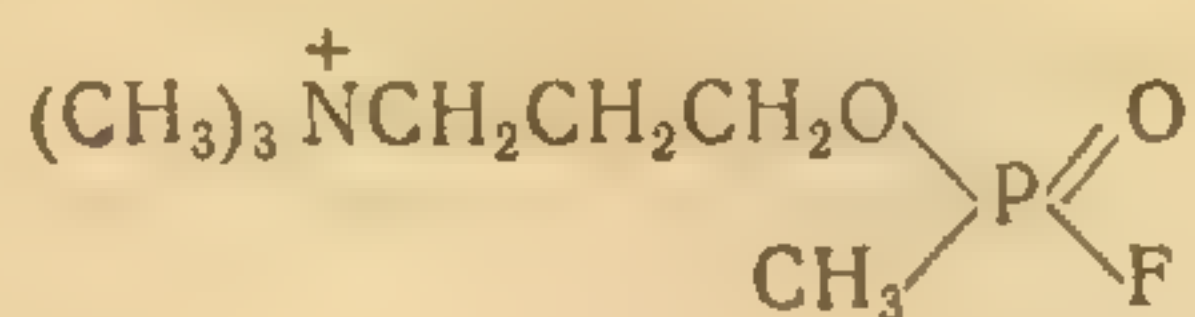
Другую группу фосфорилхолинов составляют вещества, у которых холиновый остаток служит не кислотной группой X, а одной из основных групп R или R' общей формулы строения ФОС. Примером таких соединений может быть фторметилфосфинилхолин (II).



При взаимодействии II с холинэстеразой остаток холина только притягивает молекулу ингибитора и ориентирует ее на активной поверхности фермента, а фосфорилирование происходит по разрывающейся связи P—F. Соединение II тоже очень близко по строению к зарину (остаток холина вместо изопропокси-группы), но его антихолинэстеразная активность ( $\text{pI}_{50} = 10,0$ ) в 25 раз выше, чем у зарина. Еще более мощным анти-



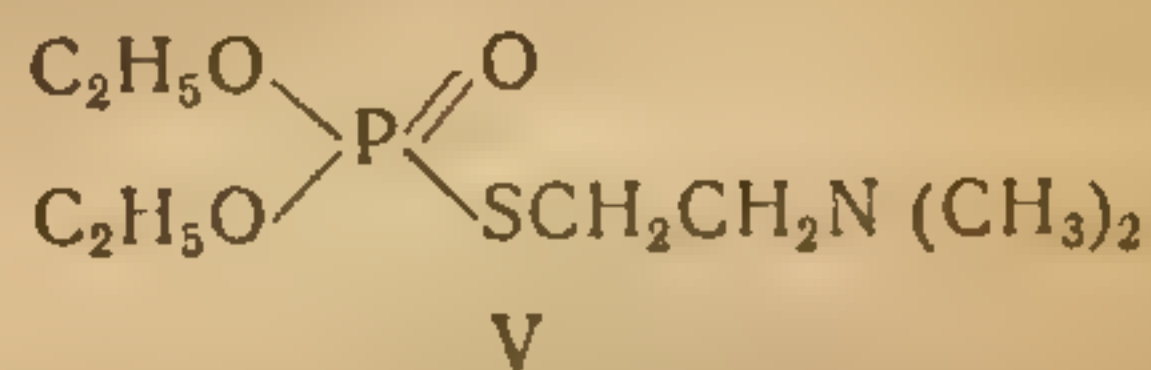
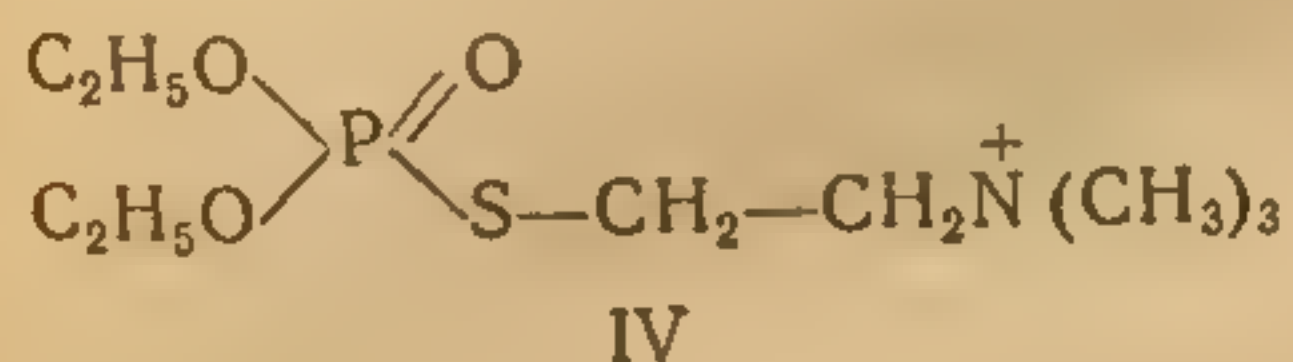
холинэстеразным действием обладает ближайший гомолог II — фторметилфосфинилгомохолин (III):



III

$\text{pI}_{50}$  для III составляет 11,0, т. е. он в 10 раз более активен, чем II, и в 250 раз активнее зарина. Такая высокая антихолинэстеразная эффективность III является несколько неожиданной, так как его молекулярное соответствие активной поверхности холинэстеразы должно быть хуже, чем у вещества II, содержащего остаток холина. По мнению Хита (Heath, 1961), это можно объяснить тем, что при расположении молекулы II на активной поверхности фермента связь  $\text{P}-\text{F}$  занимает позицию, пространственно не благоприятствующую осуществлению реакции с эстеразным центром. В случае взаимодействия с ферментом соединения III, содержащего более длинную углеродную цепочку, имеется больше возможностей для более благоприятного расположения  $\text{P}-\text{F}$  связи.

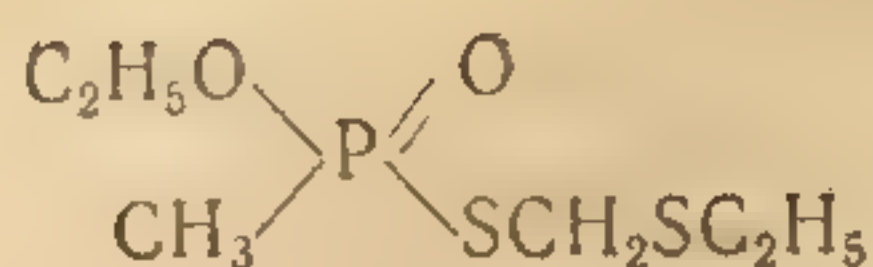
С помощью азотсодержащих ФОС далеко не всегда удается ясно продемонстрировать роль положительного заряда. Например, диэтилфосфорилтиохолин (IV) обладает всего в 5 раз большей антихолинэстеразной активностью, чем его третичный аналог (V) (Tammelin, 1957).



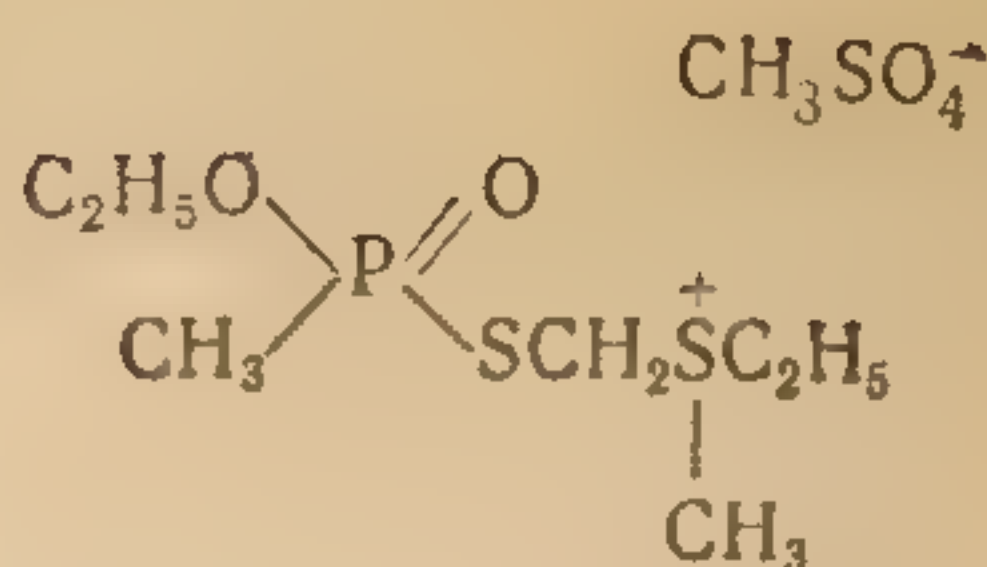
Это зависит от того, что при  $\text{pH} = 7,5-8,0$ , при котором обычно производится исследование, соединение V в значительной степени находится в диссоциированной (протонированной) форме, т. е. тоже несет положительный заряд. Возможность диссоциации азотсодержащих ФОС, как и других аминов, всегда нужно учитывать, причем необходимо помнить, что степень диссоциации разных соединений при одном и том же  $\text{pH}$  может оказаться различной, так как она зависит от величины  $\text{pK}$  каждого соединения.

Роль заряда гораздо отчетливее выявляется на примере серусодержащих ФОС, у которых заряд может быть создан превращением незаряженной сульфидной серы в ион сульфония, что достигается, например, путем сульфометилирования.





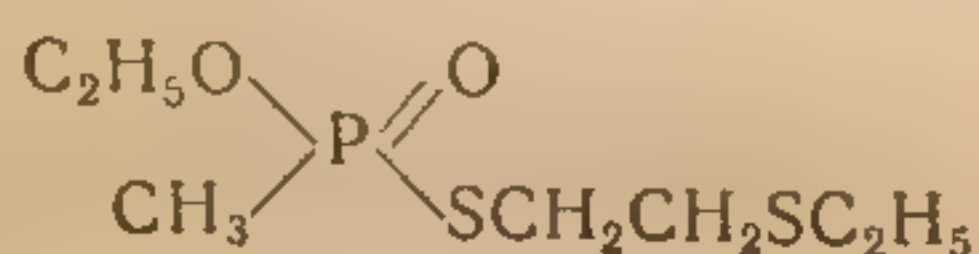
М-136 (СУЛЬФИД)



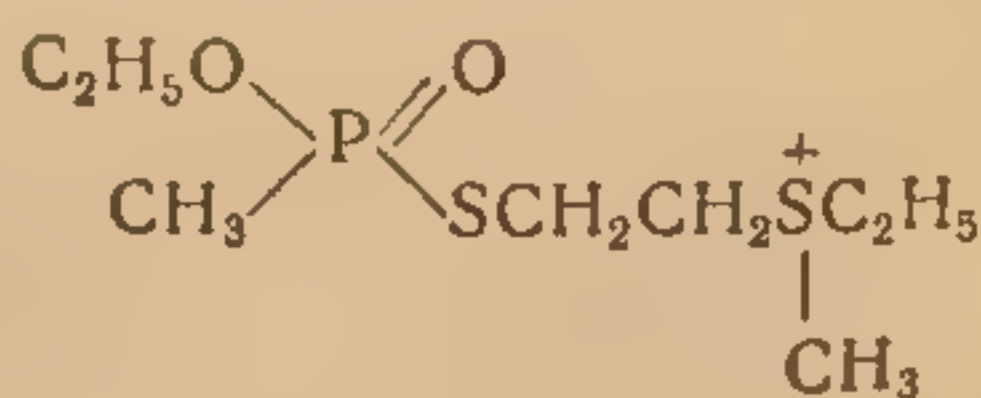
М-137 (СУЛЬФОНИЙ)

Преимущество этих соединений состоит в том, что сульфидная форма таких ФОС (в отличие от производных холина) совершенно не подвержена ионизации, тогда как сульфониевая форма полностью ионизирована при всех значениях pH.

Сравнительное изучение действия ФОС этого типа на холинэстеразу проводили многие исследователи (Э. В. Зеймаль и др., 1957, 1962; Я. С. Смусин, 1957, 1958; И. В. Семенов и Н. К. Фруентов, 1957, 1958; В. А. Яковлев и др., 1961; Р. И. Волкова и др., 1961; М. Я. Михельсон и др., 1961; Л. Г. Магазаник и И. В. Семенов, 1962; Ю. С. Каган, 1962; Е. К. Рожкова и др., 1962; В. А. Яковлев и Р. И. Волкова, 1962; Fukuto et al., 1955; Heath, Vandekar, 1957). Результаты во всех случаях получились совершенно однозначные: сульфониевые соединения всегда проявляли значительно более выраженную антихолинэстеразную активность, чем сульфидные. Иногда это различие было тысячекратным и более. Например, константы скорости угнетения холинэстеразы эритроцитов веществами Гд-7 и Гд-42 составляли соответственно  $1,0 \cdot 10^4$  и  $3,5 \cdot 10^7$ , т. е. Гд-42 оказался в 3500 раз более эффективным ингибитором, чем Гд-7 (В. А. Яковлев и Р. И. Волкова, 1962).



Гд-7

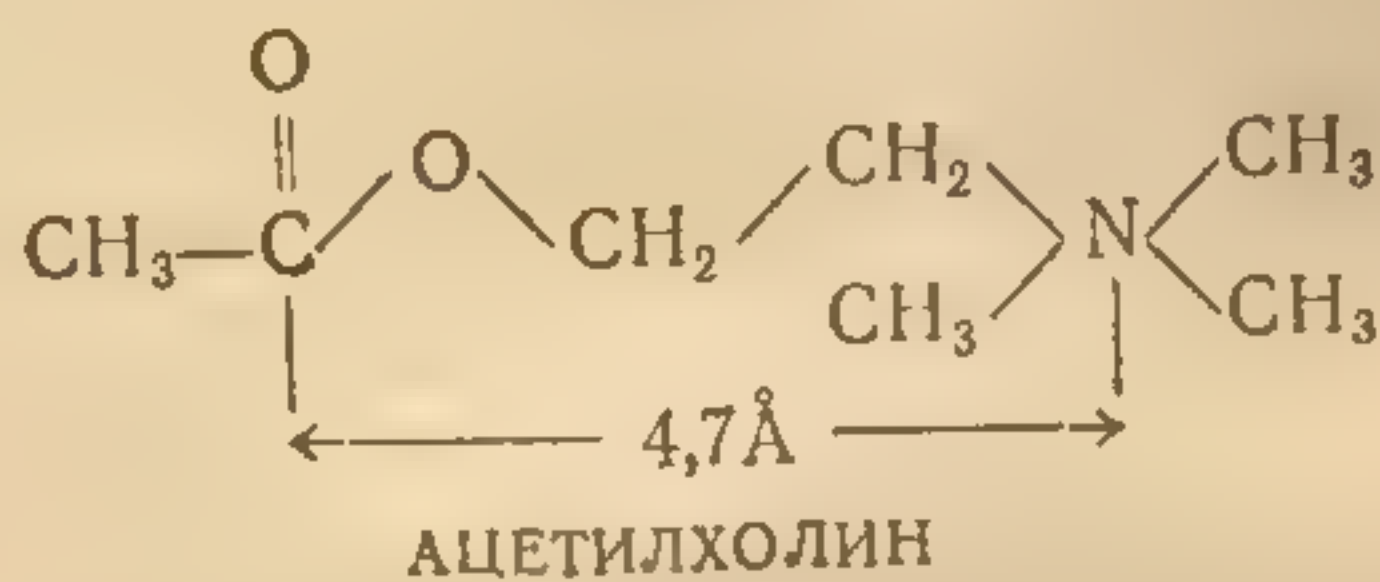
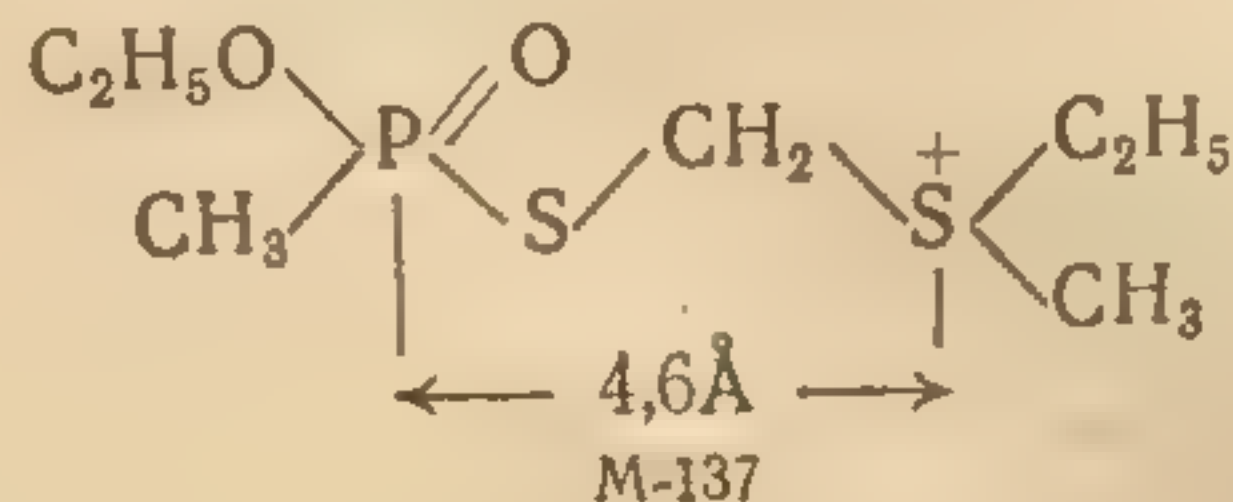


Гд-42

Было изучено значение положения заряда в молекуле для проявления антихолинэстеразного действия ФОС этого типа (Р. И. Волкова и др., 1961). Для этой цели были синтезированы вещества, подобные Гд-7 и Гд-42, но отличающиеся друг от друга числом метиленовых групп (от 1 до 4) между обоими атомами серы. Для сульфидных соединений типа Гд-7 это изменение структуры практически не влияло на антихолинэстеразную активность. В отличие от этого, в ряду сульфониевых соединений типа Гд-42 удлинение цепи существенно снижало способность угнетать холинэстеразу. Иначе говоря, по мере удаления положительного заряда от атома фосфора антиэстеразная эффективность уменьшалась. Самым активным оказалось соеди-

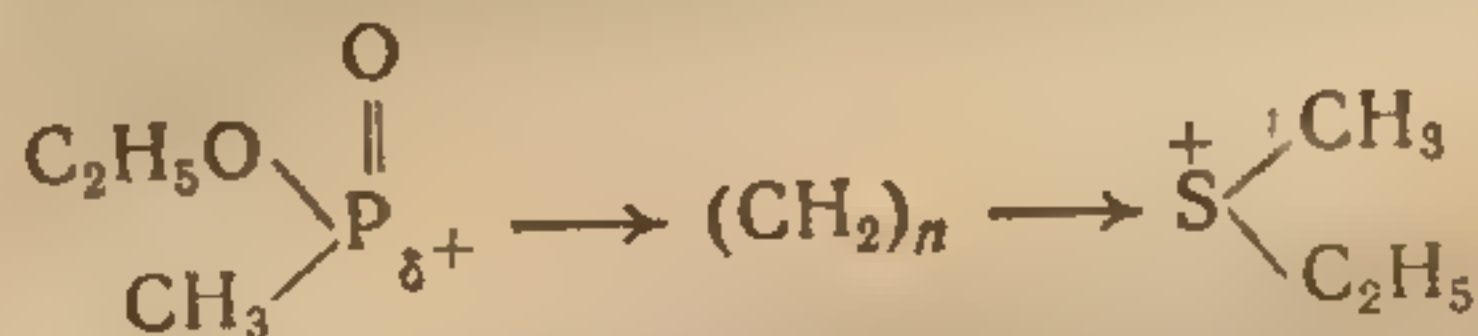


нение, содержащее одну метильную группу (М-137). Расчеты показали, что в этом соединении расстояние между положительно заряженной серой и фосфором составляет 4,6 Å, т. е. очень близко к тому, которое существует между азотом и карбонильным углеродом в ацетилхолине (4,7 Å).



Можно думать, что соединение М-137 обладает наиболее полной молекулярной комплементарностью по отношению к активной поверхности холинэстеразы, т. е. здесь лучше всего проявляется ориентирующее влияние положительного заряда.

Однако нельзя исключить и другую возможность. Дело в том, что появляющийся в молекуле положительный заряд действует не только как фактор, способствующий ориентации, но оказывает и индукционный эффект, т. е. вызывает смещение электронного облака по цепи атомов, увеличивает электронный пробел (т. е. положительный заряд) на атоме фосфора и тем самым повышает фосфорилирующую способность соединения.



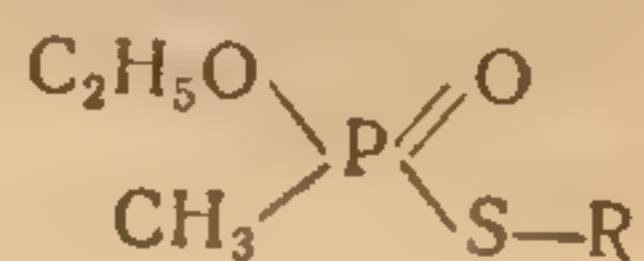
Известно, что по мере удлинения цепи индукционный эффект быстро ослабевает, и поэтому самым большим он должен быть у соединения с одной метиленовой группой (М-137), т. е. у того, которое обладало наиболее выраженной антихолинэстеразной активностью.

Окончательное решение вопроса о том, какое из этих двух влияний (ориентирующее действие или индукционный эффект) ответственно за повышение мощности ингибитора, представляется чрезвычайно трудным. Пытаясь выяснить этот вопрос, В. А. Яковлев и Р. И. Волкова (1962) определили при разных температурах константу скорости взаимодействия веществ Гд-7 и Гд-42 с холинэстеразой и на основании этих данных вычислили энергию активации реакции. Оказалось, что переход от сульфидной формы к сульфониевой не сопровождается сниже-

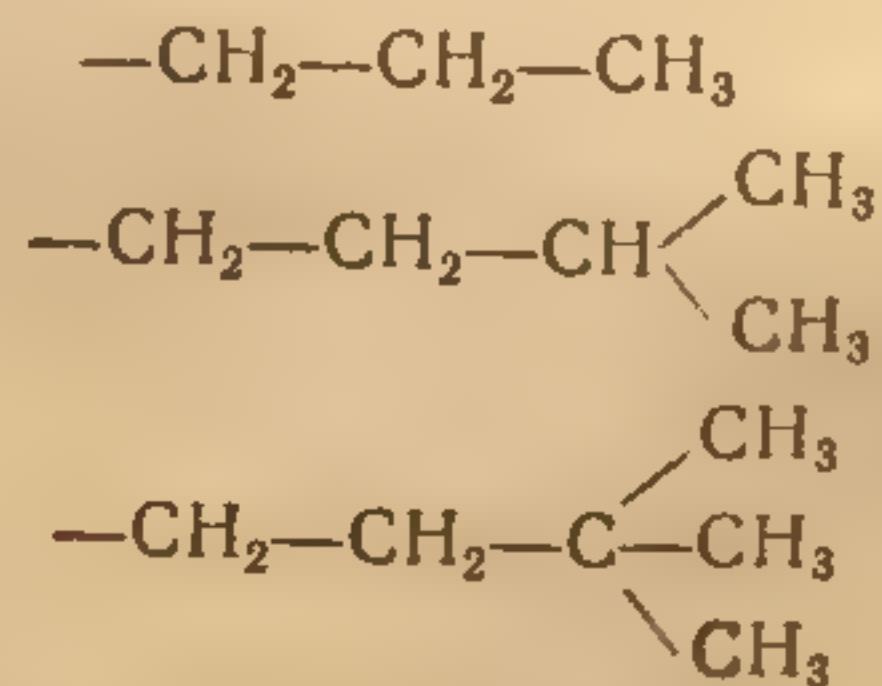


нием энергии активации, т. е., по-видимому, не облегчает реакцию фосфорилирования эстеразного центра (из двух этапов, составляющих процесс взаимодействия ингибитора с ферментом, только реакция фосфорилирования идет с энергетическим барьером). Это позволило авторам сделать вывод, что роль положительного заряда (по крайней мере, в ФОС этого типа) сводится почти исключительно к ориентирующему влиянию: положительный заряд притягивается к анионному центру фермента, способствует сближению ингибитора с активной поверхностью и тем самым существенно повышает долю эффективных соударений фосфорильной группировки ингибитора с эстеразным центром.

Ориентирующее влияние может определяться не только наличием положительного заряда в молекуле ФОС. В главе, посвященной активной поверхности холинэстеразы, было отмечено, что в образовании комплекса фермент — субстрат существенную роль играют ван-дер-ваальсовы силы межмолекулярного взаимодействия, которые действуют на коротком расстоянии, но при наличии достаточно большого числа соприкасающихся атомов могут оказать значительный эффект. Можно думать, что и при реакции ингибитора с ферментом эти силы имеют немаловажное значение. Этот вопрос был обстоятельно изучен Н. Н. Годовиковым и др. (1963). Авторы синтезировали и исследовали ряд ФОС следующего строения:



В этих соединениях R представлял собой обычный алкил, лишенный каких бы то ни было гетероатомов, способных к ионизации. Было установлено, что в ряду алкилов нормального строения при постепенном увеличении длины цепи (от этила до гексила) антихолинэстеразная активность существенно увеличивалась, что можно объяснить увеличением поверхности контакта между ингибитором и ферментом. Особый интерес в этой группе соединений представляет ряд, в котором изменение структуры алкильного радикала носило следующий характер:



В этом ряду на расстоянии двух метиленовых групп от атома серы находятся одна, две или три метильные группы. Ока-

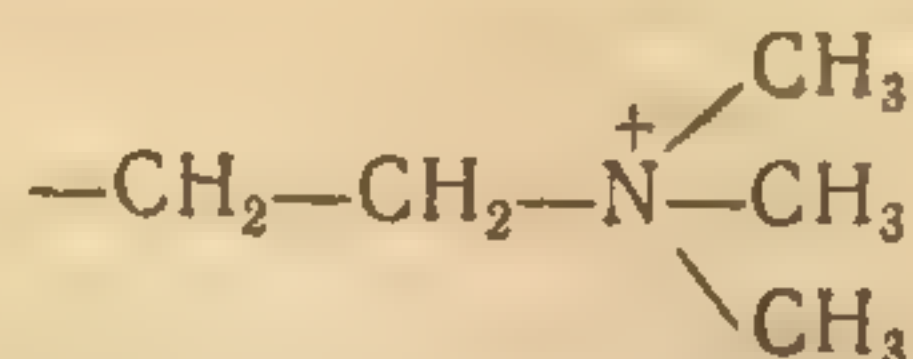
Вывод, что...  
Здесь уместно...  
фосфорильной...  
эстеразой...  
Whitaker, 1949

Выше, при...  
эстеразы, от...  
стереоспециф...  
тические изо...  
ные ФОС то...  
(Aagon et al...  
меров ФОС

и показали...  
(в зависимости...  
D-изомер. Е...  
или, что то...  
довательно...  
вании анти...  
(Michel, 1955...  
личества дву...  
а другой сл...  
что и здесь д...  
меров зарина

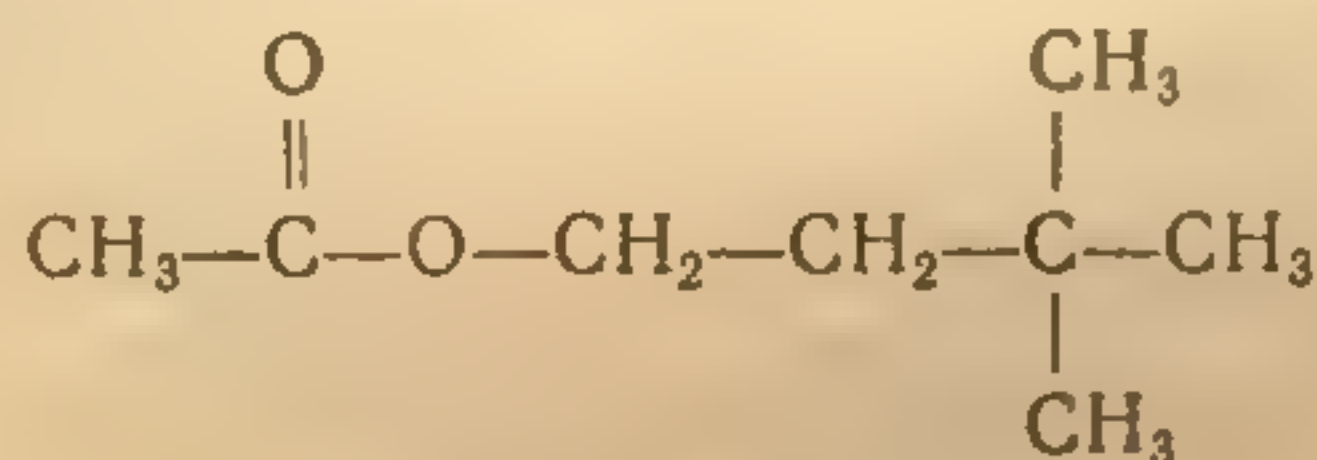


залось, что с увеличением числа метильных групп антихолинэстеразная активность резко возрастает. Последний из этих трех радикалов по строению очень напоминает остаток холина:



Возможно, что это пространственное сходство определяет высокую антихолинэстеразную активность ингибитора, содержащего такой радикал.

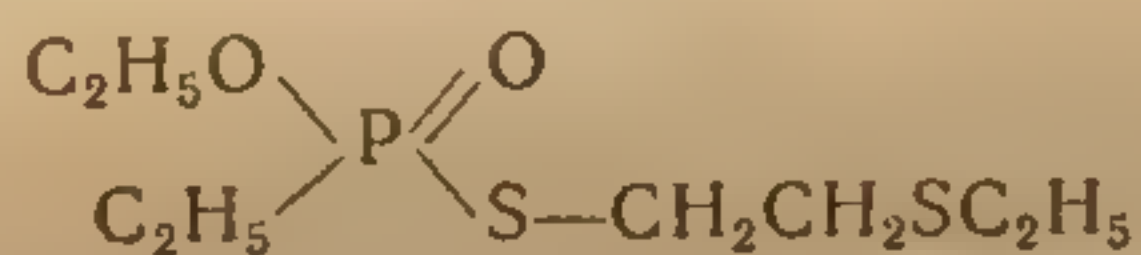
Здесь уместно напомнить (см. раздел «Субстратная специфичность»), что из нехолиновых эфиров только 3,3-диметилбутилацетат (содержащий такой же радикал) разрушается холинэстеразой почти так же быстро, как ацетилхолин (Adams, Whittaker, 1949):



3,3-ДИМЕТИЛБУТИЛАЦЕТАТ

### Значение оптической изомерии

Выше, при обсуждении субстратной специфичности холинэстеразы, отмечалось, что этот фермент обладает выраженной стереоспецифичностью и с различной скоростью разрушает оптические изомеры асимметричных субстратов. Оптически активные ФОС тоже по-разному влияют на холинэстеразу. Арон и др. (Aron et al., 1958) исследовали действие двух оптических изомеров ФОС следующего строения:



и показали, что L-изомер угнетает холинэстеразу в 10—20 раз (в зависимости от происхождения фермента) эффективнее, чем D-изомер. Еще раньше Хоскин и Трик (Hoskin, Trick, 1955) нашли, что только D-изомер табуна обладает токсическими, а следовательно, и антихолинэстеразными свойствами. При исследовании антихолинэстеразного действия чистого зарина Мичел (Michel, 1955) установил, что ингибитор содержит равные количества двух компонентов, один из которых обладает сильным, а другой слабым антиэстеразным действием. Можно думать, что и здесь дело зависит от разной способности оптических изомеров зарина подавлять активность холинэстеразы.



## Действие на разные холинэстеразы

Значительная часть ФОС в одинаковой степени угнетает активность истинной и ложной холинэстераз, но среди них нередко встречаются и избирательно действующие ингибиторы. В большинстве случаев ФОС предпочтительно тормозят ложную холинэстеразу. Незначительные изменения структуры ФОС, особенно строения алкильных заместителей при атоме фосфора, существенно влияют на избирательность действия. Например, в ряду диалкиловых эфиров п-нитрофенилфосфорной кислоты диметильное производное почти одинаково тормозит оба фермента; на истинную холинэстеразу оно действует даже несколько сильнее, чем на ложную; диэтильное производное (фосфакол) тормозит ложную холинэстеразу в 2,9 раза сильнее, чем истинную; а для диизопропильного производного это различие выражено в 10 раз (Aldridge, 1953a). Диизопропилфторфосфат (ДФФ) действует на ложный фермент в 45 раз интенсивнее, чем на истинный, тогда как ди-н-пропилфторфосфат только в 5,5 раза (Davison, 1955). Вообще наиболее выраженным избирательным действием на ложную холинэстеразу обладают ФОС, содержащие изопропильные радикалы; к ним относятся в первую очередь изо-ОМПА и мипафокс. Степень избирательности может колебаться в очень широких пределах, в зависимости от происхождения холинэстеразы, в частности от вида животного. Олдридж (Aldridge, 1953a) исследовал сравнительное действие изо-ОМПА на истинную и ложную холинэстеразу (эритроциты и сыворотка) разных видов животных и показал, что, например, у человека ложная холинэстераза тормозится в 56 раз интенсивнее, чем истинная, у крысы — в 530 раз, у морской свинки — в 3600 раз, а у собаки — в 13 200 раз. Аналогичные колебания были найдены при исследовании мипафокса. Видовые различия в чувствительности холинэстеразы к разным ФОС были подтверждены многими авторами (Asperen, Dekhuijzen, 1958; McCauley, Cook, 1959; Casida, 1955a, и др.).

Среди ФОС встречаются и избирательные ингибиторы истинной холинэстеразы. К ним относятся некоторые фосфорилхолины, особенно фторфосфорилгомохолин и метилэтоксифосфорилтиохолин (Tammelin, 1957, 1958), кислородный аналог гутиона (Du Bois et al., 1957), цис-изомер фосдрин (Casida, 1955b) и некоторые другие.

## Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС

Субстрат холинэстеразы — ацетилхолин, а также некоторые обратимые ингибиторы обладают выраженным свойством защищать фермент от необратимого угнетения ФОС. При добавлении ацетилхолина или ацетил-β-метилхолина к холинэсте-



разе одновременно с ТЭПФ или до ТЭПФ удавалось полностью предотвратить угнетение даже такими концентрациями ингибитора, которые в 100 раз превышали  $I_{50}$  (Burgen, 1949). Менее полной была защита при использовании в качестве ингибитора ДФФ (Augustinsson, Nachmansohn, 1949) или N-метилхинолинэтилфосфата (Hobbiger, 1954). По данным Олдриджа (Aldridge, 1950), фосфакол в концентрации около  $10^{-6}$  М, которая в обычных условиях вызывает 60—70%-ное угнетение, почти не угнетал холинэстеразу, если к ней был предварительно добавлен ацетилхолин. Аналогичные данные были получены и другими исследователями.

Защитное действие обратимых ингибиторов впервые продемонстрировал Берген (Burgen, 1949). Он показал, что если ТЭПФ добавлять к холинэстеразе после предварительной обработки эзерином, то наблюдаемая степень угнетения фермента всегда оказывается значительно ниже, чем можно было ожидать при суммировании действия обоих ингибиторов. Например, взятые в отдельности ТЭПФ в концентрации  $4,6 \cdot 10^{-8}$  М и эзерин в концентрации  $3,1 \cdot 10^{-8}$  М угнетали холинэстеразу соответственно на 94% и на 54%. При комбинированном же воздействии (сначала эзерин, а затем ТЭПФ) угнетение составляло 63%. Простой расчет показывает, что в этих условиях предварительная обработка эзерином более чем на 90% снижала тормозящий эффект ТЭПФ. При изменении порядка прибавления ингибиторов наблюдалось простое суммирование действия.

По данным Келле (Koelle, 1957), бис-четвертичный ингибитор холинэстеразы — амбеноний в концентрации  $8 \cdot 10^{-7}$  М на 92% защищал фермент от угнетения ДФФ. С уменьшением концентрации амбенония защитное действие снижалось.

Необходимо подчеркнуть, что защита холинэстеразы от действия ФОС с помощью обратимых ингибиторов имеет реальный смысл даже в том случае, если обратимый ингибитор приходится брать в такой концентрации, которая сама по себе вызывает значительное угнетение фермента. Дело в том, что после комбинированной обработки активность фермента легко восстановить простым разведением или отмыванием, в ходе которого не вступивший в реакцию с ферментом необратимый ингибитор тоже будет удален.

### ДЕЙСТВИЕ НА ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ

ФОС обладают способностью угнетать активность не только холинэстеразы, но и ряда других эстераз. Показана чувствительность эстеразы сыворотки крови к ДФФ (Adams, Whittaker, 1949; Webb, 1948) и три-о-крезилфосфату (Bloch, 1943). ДФФ способен также тормозить действие эстеразы печени (Webb, 1957; Boursnell a. Webb. 1949; Aldridge, 1950). Мощным инги-



ингибитором печеночной эстеразы является тетраэтилпирофосфат. В концентрации порядка  $10^{-8}$  М он угнетает активность фермента на 50%. Заслуживает внимания тот факт, что вначале тормозящее действие ТЭПФ возрастает линейно с увеличением концентрации яда, но последние 10% ферментативной активности удается подавить лишь с большим трудом, путем значительного (в несколько сот раз) увеличения концентрации ингибитора (Wilson et al., 1952).

В отличие от эстеразы печени, панкреатическая липаза устойчива к высоким концентрациям ДФФ. По некоторым данным, ДФФ не только не тормозит панкреатическую липазу, но даже стабилизирует ее, предохраняя от инактивации, наступающей при хранении (Desnuelle et al., 1956). Более полные данные о влиянии ФОС на эстеразу были получены в тех исследованиях, где в качестве субстратов действия ферментов применялись вещества различного строения. Так, в работе Миерса и др. (Myers et al., 1955) было установлено, что в поджелудочной железе содержатся три фермента, отличающиеся друг от друга по субстратной специфичности и способности угнетаться фосфорорганическими ингибиторами. Чувствительной к ФОС оказалась только эстераза, специфически действующая на фениловые эфиры, но не гидролизующая триглицериды.

В последние годы Денюэль и сотр. (Marchis-Mouren et al., 1959; Desnuelle et al., 1960; Desnuelle, 1960, 1961) тщательно проанализировали действие ФОС на панкреатическую липазу и выяснили некоторые интересные особенности этого процесса. Оказалось, что в очищенном виде панкреатическая липаза не гидролизует сложные эфиры, находящиеся в истинном растворе, но хорошо разрушает их, если они находятся в состоянии эмульсии. Такая же картина наблюдалась и при угнетении липазы паратионом. До тех пор, пока ингибитор находился в растворе, угнетения не было, даже если раствор был близок к насыщенному. Но стоило еще немного повысить концентрацию паратиона, чтобы образовалась эмульсия, как сразу наступало резкое угнетение активности фермента. Таким образом, взаимодействие панкреатической липазы как с субстратом, так и с ингибитором может протекать только в гетерогенной среде.

По данным Уэбба (Webb, 1948), ДФФ в относительно высокой концентрации (порядка  $10^{-3}$  М) тормозит активность кислой (и в меньшей степени — щелочной) фосфатазы почек и пирофосфатазы дрожжей. Некоторые ФОС угнетали также кислотную фосфатазу картофеля (Loga-Tamayo et al., 1962).

В последние годы были получены интересные сведения о влиянии ФОС на протеолитические ферменты.

Янсен и сотр. (Jansen et al., 1949a) установили, что как эстеразное, так и протеолитическое действие трипсина и химотрипсина отчетливо угнетается ДФФ. Другие фосфорсодержащие



яды — ГЭТФ, ТЭПФ, фосфакол и паратион также подавляют активность этих ферментов, но тормозящее действие в случае их применения развивается медленнее (Jansen et al., 1949б; Hartley, Kilby, 1950). При исследовании механизма действия фосфакола на трипсин первоначально было высказано мнение, что точка приложения действия этого ингибитора близко расположена к активному центру фермента, но не совпадает с ним. Этот вывод был основан на том, что в присутствии 8 М мочевины реакция между фосфаколом и трипсином протекает (происходит отщепление п-нитрофенола), а ферментативная активность не снижается (Viswanatha, Liener, 1956). В дальнейшем более точные исследования не подтвердили эти данные, и был сделан вполне убедительный вывод, что место атаки ФОС не может быть иным, чем активный центр фермента (Harris, Hartley, 1956).

При исследовании действия ФОС на «нейтральную» протеиназу гомогенатов нервов и мозга кур было установлено, что ТЭПФ и ДФФ выраженно угнетают этот фермент в концентрации  $10^{-5}$  М. Несколько слабее действовал паратион ( $10^{-4}$  М). Триортокрезилфосфат и мипафокс не проявляли тормозящего действия (Millo, Breelatti, 1961).

Миллер и ван-Вунакис (Miller, van Vunakis, 1956) показали, что ДФФ в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  М тормозит как свертывающее (протеолитическое) действие тромбина, так и его эстеразную активность, измеряемую по способности гидролизовать метиловый эфир п-толуолсульфониларгинина. При этом оказалось, что ДФФ совершенно не влияет на протромбин и не тормозит превращение протромбина в тромбин.

По данным Маунтера и Шипли (Mounter, Shipley, 1958), некоторые ФОС тормозят активность плазмينا, полученного из крови человека. Наиболее активным ингибитором оказался ди-н-бутилфторфосфат ( $PI_{50} = 4,2-4,5$ ). ДФФ действовал несколько слабее ( $PI_{50} = 3,4-3,7$ ). Еще более слабым действием обладал диэтилфторфосфат, а ТЭПФ, тетра-н-пропилпирофосфат и некоторые диалкилпроизводные 2, 2'-дихлорвинилфосфата практически не влияли на активность плазмينا. Взаимодействие ингибиторов с плазмином протекало по типу бимолекулярной реакции. Ни одно из исследованных ФОС не влияло на активность плазминогена.

ДФФ тормозит активность некоторых сульфгидрильных протеаз растительного происхождения (бромелин, папаин, фицин). 50%-ное угнетение бромелина достигалось при концентрации ДФФ  $4 \cdot 10^{-4}$  М. Предварительное блокирование SH-групп ферментов п-хлормеркурибензоатом полностью предохраняло ферменты от угнетающего действия ДФФ (Heinicke, Mori, 1959). По данным Масуда (Masuda, 1959), ДФФ угнетает действие папаина, только активированного цианидом. Папаин, активированный другими соединениями (цистеин, тиогликолат, сероводо-



род). а также ничем не активированный, не изменял своего действия в присутствии ДФФ. Эбата и др. (Ebata et al., 1962) показали, что избыток активатора препятствует развитию тормозящего действия ДФФ на сульфгидрильные протеазы. ДФФ в концентрации порядка  $10^{-4}$  М тормозил действие бактериальной протениназы (Matsubara, Nishimura, 1958). Лейцинаминопептидаза и карбоксипептидаза оказались устойчивыми к ДФФ (Mounter et al., 19576).

А. В. Захарова и В. И. Розенгарт (1949) исследовали влияние ДФФ на гликолиз в мышечной ткани. Они показали, что в концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М ДФФ тормозит гликолиз на 60—70%. Было установлено, что это действие ДФФ состоит в нарушении начальных этапов гликолитического процесса, предшествующих образованию гексозодифосфата.

Поле и Андре (Paulet, Andre, 1957) показали, что ДФФ и ТЭПФ тормозят *in vitro* потребление кислорода срезами мозга, однако это действие они проявляли лишь в относительно высокой концентрации ( $10^{-3}$  —  $10^{-4}$  М). Примерно в этой же концентрации ДФФ тормозит некоторые дегидрогеназы мозга (Michaelis et al., 1949). Приведенные данные не согласуются с исследованиями Томпсона (Thompson, 1957), который нашел, что ДФФ и триортокрезилфосфат ни *in vitro*, ни *in vivo* не влияют на потребление кислорода и окислительное фосфорилирование в срезах мозга кур.

И. А. Франков (1959) исследовал действие 10 производных диэтилфосфорной кислоты на активность каталазы и пероксидазы крови человека. Только соединение  $(C_2H_5)_2P(O) \cdot OCH_2C(O)OC_2H_5$  в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М незначительно угнетало оба фермента. Остальные изученные вещества проявляли заметное тормозящее действие лишь в концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Неожиданные результаты были получены при изучении влияния ФОС на пероксидазу молока (Kuegmeier et al., 1961, 1962). Оказалось, что нет параллелизма между способностью ФОС угнетать пероксидазу и холинэстеразу. Так, активный ингибитор холинэстеразы — фосфакол в концентрации до  $10^{-2}$  М не влиял на пероксидазу, паратион в концентрации  $10^{-5}$  М вызывал незначительное торможение, а аминопаратион, практически не действующий на холинэстеразу, подавлял активность пероксидазы на 93% в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Производные систокса совершенно не влияли на активность оксидазы аскорбиновой кислоты листьев яблони (Л. П. Бочарова и Н. С. Украинец, 1958). Устойчивыми к ДФФ оказались диафораза, угольная ангидраза и цитохромоксидаза (Webb, 1948).

Некоторые ФОС в концентрации  $10^{-3}$  —  $10^{-5}$  М незначительно подавляли активность гиалуронидазы и вызывали заметную деполимеризацию гиалуроновой кислоты (В. К. Кухта, 1961). Мипафокс *in vitro* не влиял на биосинтез липидов в нервной



ткани, оцениваемый по скорости включения меченых холина, ацетата и фосфата в липиды (Majno, Karnovsky, 1961).

Кратко подытоживая обширные литературные данные о действии ФОС на ферменты, можно констатировать, что только холинэстераза и немногие другие эстеразы проявляют избирательную чувствительность к этим ядам и нередко утрачивают свою активность при действии ничтожно малых концентраций ФОС, порядка  $10^{-9}$  —  $10^{-11}$  М.

Способность ФОС угнетать холинэстеразу была положена в основу обнаружения ФОС и их количественного определения (А. А. Покровский, 1958; Nesheim, Cook, 1959). Разработанные на базе этого принципа методы оказались весьма чувствительными и значительно превосходили обычные химические способы определения ФОС. Например, по данным И. Д. Неклесовой (1963), дитиофос удавалось определять в концентрации 0,000005%.

## РЕАКТИВИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, УГНЕТЕННОЙ ФОС

### СПОНТАННАЯ РЕАКТИВАЦИЯ

Как было показано в предыдущем разделе, реакция холинэстеразы с ФОС состоит в присоединении фосфорильного остатка ингибитора к нуклеофильной группе эстеразного центра



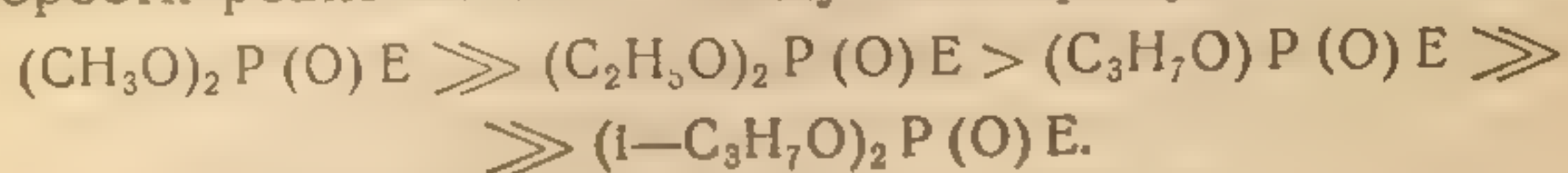
Рассмотрение этого уравнения позволяет сделать два важных вывода. Во-первых, строение фосфорилированного (т. е. угнетенного) фермента  $(RO)_2P(O)E$  не зависит от природы кислотной группы X, которая отщепляется в ходе реакции, а определяется только характером радикалов, присоединенных к атому фосфора. Во-вторых, фосфорилированный фермент можно рассматривать как фосфорный эфир, который под действием нуклеофильных реагентов, например воды, должен подвергаться гидролизу:



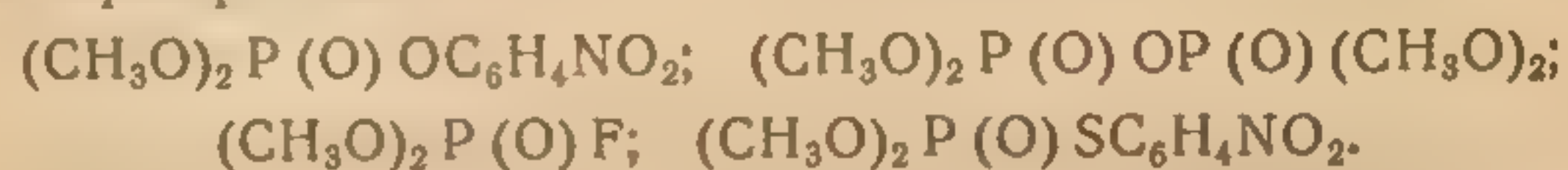
В ходе этой реакции активность фермента восстанавливается, т. е. происходит реактивация холинэстеразы. Эта реакция протекает по уравнению первого порядка, и скорость ее быстро возрастает с повышением температуры (Aldridge, 19536). Скорость такой реактивации, которую можно назвать спонтанной, так как вода всегда присутствует в реакционной смеси, в очень большой степени зависит от строения фосфорильного остатка ингибитора. Лучше всего реактивируется диметоксифосфорилфермент  $(CH_3O)_2P(O)E$ . По данным Дэвисона (Davison, 1955), фосфорилированная холинэстераза эритроцитов кро-



лика такого строения уже после 40-минутной инкубации при 37° восстанавливает 25% утраченной активности. Значительно медленнее отщепляется диэтоксифосфорильный остаток. Так, холинэстераза электрического угря, угнетенная ТЭПФ, реактивируется на 45% только через 28 дней (Wilson, 1951). Дальнейшее увеличение  $n$ , особенно, разветвление алкильных радикалов при фосфоре еще больше затрудняет процесс реактивации. Экспериментальные данные по этому вопросу хорошо совпадают друг с другом и дают четкую картину, показывающую уменьшение скорости реактивации в следующем ряду:



При исследовании спонтанной реактивации было очень убедительно подтверждено уже высказанное выше положение, что скорость реактивации не зависит от строения кислотной группы ингибитора. Олдридж и Дэвисон (Aldridge, Davison, 1953) обрабатывали холинэстеразу эритроцитов кролика следующими диметоксифосфатами:



Хотя антихолинэстеразная активность этих соединений оказалась совершенно различной и для достижения одинаковой степени угнетения приходилось использовать разную концентра-

цию ингибиторов и в широких пределах варьировать продолжительность контакта фермента с ядом, скорость реактивации оказалась совершенно одинаковой во всех случаях.

Реактивация в очень большой степени зависит и от природы фермента. Во всех случаях при применении одного и того же ингибитора ложная холинэстераза реактивируется труднее, чем истинная (Davison, 1955). Существенные различия наблюдаются также в зависимости от вида животного (табл. 14).

Интересное наблюдение сделал Дэвисон (1953). Он пока-

зал, что ложная холинэстераза мозга крыс реактивируется во много раз медленнее, чем ложная холинэстераза других органов (сыворотки, сердца, диафрагмы, кишечника) того же вида жи-

Таблица 14

Скорость спонтанной реактивации диэтоксифосфорилированной ложной холинэстеразы разных видов животных и человека (Davison, 1955)

Вид животного	Время, необходимое для восстановления активности на 25% (в ч)
Курица . . . . .	0,9
Крыса . . . . .	2,1
Морская свинка . . . . .	30
Лошадь . . . . .	82
Человек . . . . .	310



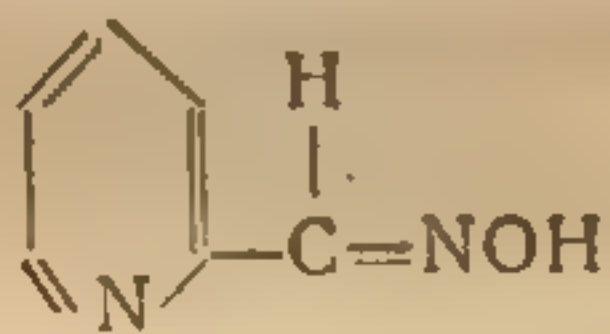
вотных. Это наблюдение может служить свидетельством того, что ложная холинэстераза мозга отличается по строению от аналогичных ферментов иного происхождения.

Скорость спонтанной реактивации зависит от pH, причем эта зависимость оказалась совершенно различной у ферментов разного вида. Так, у ложной холинэстеразы скорость реактивации быстро увеличивалась при сдвиге реакции среды в кислую сторону, тогда как для истинной холинэстеразы найден отчетливый оптимум реактивации при pH = 7,8. Эффект pH совершенно не зависел от природы ингибитора (Davison, 1955).

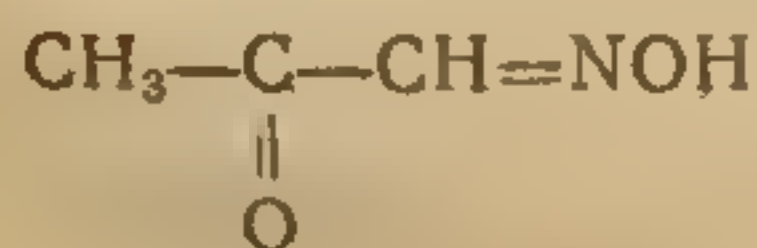
#### ВОССТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ РЕАКТИВАТОРОВ

Было естественно предположить, что если некоторая реактивация угнетенной холинэстеразы происходит даже под влиянием такого слабого нуклеофильного реагента, как вода, то усиление нуклеофильности воздействующего агента должно сопровождаться более выраженным реактивирующим эффектом. И действительно, в 1951 г. Вильсон (Wilson, 1951) показал, что процесс реактивации значительно ускоряется, если к угнетенному ферменту добавить гидроксилламин ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) или близкие к нему по строению вещества. С усилением нуклеофильности реактивирующая способность соединений резко возрастала. Выраженным реактивирующим действием обладали некоторые гидроксамовые кислоты — в частности, метйодид никотингидроксамовой кислоты и бетанигидроксамовая кислота (Wilson, Meislich, 1953; Wilson, 1955), а также хлоргидрат пиколингидроксамовой кислоты (Wilson, Giusburg, 1955b).

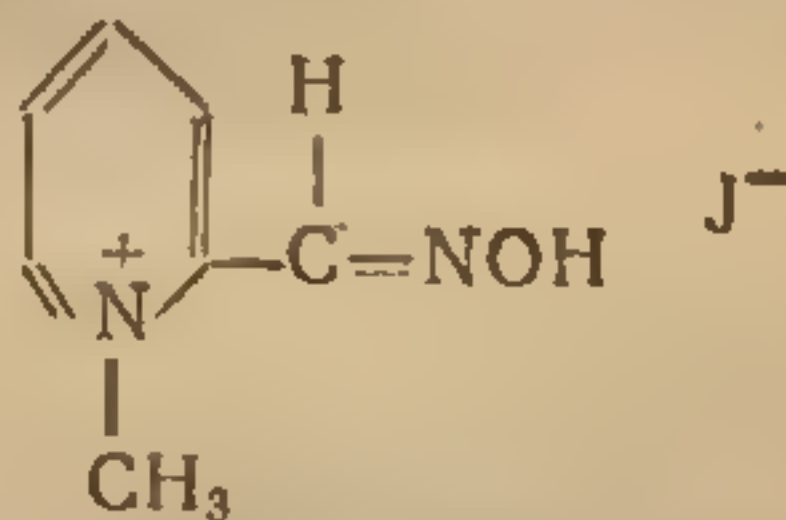
В дальнейшем Вильсон установил, что исключительно мощной реактивирующей способностью обладает 2-пиридинальдоксимметйодид (ПАМ). Обработка этим соединением (в концентрации  $10^{-3}$  M) холинэстеразы, угнетенной ТЭПФ, через 1 мин реактивировала фермент на 94%, т. е. практически полностью. Сравнительные исследования показали, что ПАМ реактивирует угнетенную холинэстеразу в несколько тысяч раз лучше, чем третичный 2-пиридинальдоксим (Wilson, Giusburg, 1955a)



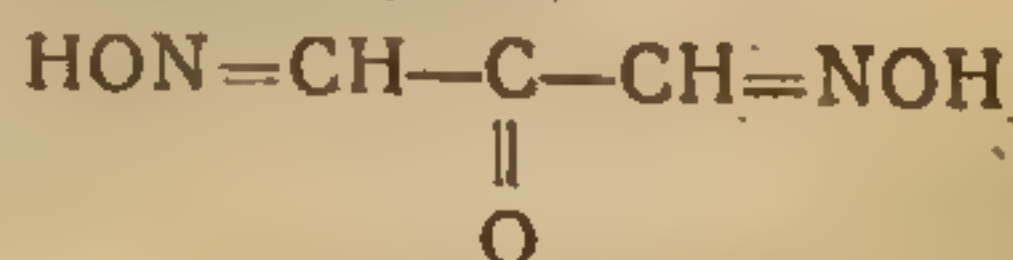
ПИРИДИН-2-АЛЬДОКСИМ



МОНОИЗОНИТРОЗОАЦЕТОН (МИНА)



ПИРИДИН-2-АЛЬДОКСИМ-  
МЕТЙОДИД (ПАМ)



ДИИЗОНИТРОЗОАЦЕТОН (ДИНА)



Преимущество йодметилированного пиридинальдоксима перед третичным соединением можно объяснить тем, что наличие положительного заряда при азоте помогает реактиватору приблизиться к молекуле угнетенного фермента благодаря электростатической связи, образующейся между этим зарядом и анионным центром фермента.

Очень высокой реактивирующей способностью, не уступающей ПАМ, обладают также некоторые оксоальдоксимы (мононитрозоацетон, диизонитрозоацетон). Чайлдс и др. (Childs et al., 1955) провели сравнительное исследование способности большого числа оксимов и гидроксамовых кислот реактивировать холинэстеразу мозга, угнетенную зарин. Они показали, что все изученные соединения по своей активности могут быть разбиты на 4 группы.

1. Вещества, обеспечивающие более чем 50%-ное реактивирование за 1 ч: диизонитрозоацетон, изонитрозоацетофенон, мононитрозоацетон, фенилглиоксим, ПАМ, пиридин-4-альдоксимметйодид.

2. Вещества, обеспечивающие 50%-ное реактивирование за 24 ч: диизонитрозоциклогексанон, глюоксим, изонитрозоацетилацетон, изатин- $\beta$ -оксим, пиридин-2-альдоксим, пиридин-4-альдоксим, салицилальдоксим, триизонитрозопропан, йодметилат никотингидроксамовой кислоты, пикотингидроксамовая кислота и пиримидин-2-гидроксамовая кислота.

3. Вещества, обеспечивающие 20%-ное реактивирование за 24 ч: о-хлорбензальдоксим, диацетилмоноксим, метилглиоксим, пиридин-3-альдоксимметйодид, пирогаллальдоксим, фуругидроксамовая кислота, салицилгидроксамовая кислота.

4. Вещества, которые за 24 ч реактивируют фермент менее чем на 10%: ацетоксим, циклогексан-1, 2-диондиоксим, галлацетофеноноксим, глюкозоксим, о-оксиацетофеноноксим, м- и п-оксibenзальдоксимы, изонитрозодимедон, пантан-2, 3, 4-трион-2 3-диоксим, пиридин-3-альдоксим, бензгидроксамовая кислота, изоникотингидроксамовая кислота, п-метилбензгидроксамовая кислота, тропогидроксамовая кислота.

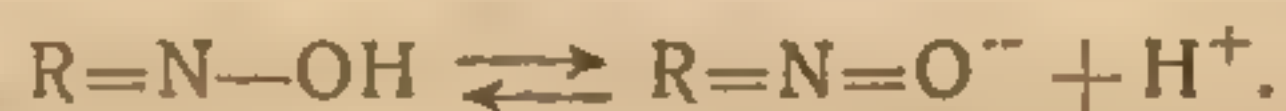
Начиная с 1955 г., число исследований, посвященных реактиваторам холинэстеразы, неуклонно и очень быстро возрастало, потому что стало известно, что многие из этих соединений могут быть использованы в качестве антидотов при отравлениях фосфорорганическими ядами. В настоящее время литература по этому вопросу чрезвычайно обширна. Частично она была обобщена в различных обзорах и монографиях (Holmstedt, 1959; O'Brien, 1960; Heath, 1961, и др.). Достаточно подробные обзоры о свойствах и применении реактиваторов холинэстеразы имеются и на русском языке (Г. А. Степанский, 1958; С. Н. Голиков и В. И. Розенгарт, 1960; Г. А. Степанский, 1961).



Поэтому в данной книге мы ограничимся изложением лишь общих положений, а также наиболее новых данных, которые появились после выхода в свет указанных обзоров.

### Кинетика и механизм реактивации

Кинетические исследования Дэйвиса и Грина (Davies, Green, 1956) показали, что процесс реактивации протекает по уравнению второго порядка. При этом была установлена четкая зависимость скорости реактивации от рН. При использовании в качестве реактиватора мононитрозоацетона резко выраженный максимум реактивации наблюдался при рН = 7,8. Из этих исследований совершенно однозначно вытекает, что реактиваторы, имеющие строение оксимов или гидроксамовых кислот, проявляют свое действие только в ионизированном виде, в форме анионов. Ионизация оксимов происходит следующим образом:



Реактивирующей активностью обладает только анион  $R=N-O^-$ .

В дальнейшем было установлено (Green, Smith, 1957, 1958а, б), что в процессе реактивации оксимами сначала образуется комплекс между реактиватором и угнетенным ферментом. В случае применения ПАМ комплексообразование обеспечивается, вероятно, связью между положительно заряженным атомом азота и анионным центром фермента. В случае выбора МИНА и близких к нему 2-оксоальдоксимов в комплексообразовании участвует какой-то другой участок фермента, который связывается с карбонильной группой реактиватора. В оксимах типа  $RC(O)CH=NOH$  изменение структуры радикала R не влияло существенно на реактивирующую активность.

Таким образом, весь процесс реактивации можно изобразить следующим образом:



Здесь A — анион оксима; NEP — фосфорилированный фермент;  $NE^+$  — активный фермент. На первом этапе происходит образование комплекса между реактиватором и угнетенным ферментом ( $A^- \cdot NEP$ ), а затем этот комплекс разрушается с образованием активного фермента и продуктов взаимодействия реактиватора с фосфорильной группой яда. Из приведенного уравнения видно, что суммарную скорость реактивации определяют два фактора: прочность комплекса между реактиватором и угнетенным ферментом и скорость реакции дефосфорилирования. Образование комплекса представляет собой обратимый



мый процесс, и прочность комплекса зависит от константы равновесия  $K_A$ , характеризующей эту обратимую реакцию. Чем больше величина  $K_A$ , тем менее прочен комплекс. Скорость реакции дефосфорилирования прямо определяется константой скорости  $k_3$ . Из сказанного совершенно очевидно, что общая эффективность реактивации будет прямо пропорциональна величине  $k_3$  и обратно пропорциональна величине  $K_A$ , т. е., в конечном счете, она определяется отношением  $\frac{k_3}{K_A}$ . При расчете

этих величин необходимо учитывать уже отмеченный выше факт, что в непосредственную реакцию с угнетенным ферментом вступает только анионная форма оксима, т. е. нужно вносить поправку на концентрацию этой формы, которая зависит от рК оксима и рН среды, в которой происходит реактивация.

Табл. 15 иллюстрирует значение каждой из двух величин в определении общей скорости реактивации. Из таблицы видно, что каждая из этих двух величин может очень существенно влиять на общую скорость реактивации. Например, моноизонитрозоацетон лучше дефосфорилирует угнетенный фермент, чем пиридин-2-альдоксимметйодид; однако последний является значительно более эффективным реактиватором, так как образует более прочный комплекс с угнетенным ферментом.

Таблица 15

Величины констант, определяющих скорость реактивации  
диэтоксифосфорилированной холинэстеразы эритроцитов человека  
(Green, Smith, 1958a, 6)

Реактиватор	$K_A$	$k_3$	$\frac{k_3}{K_A}$
Моноизонитрозоацетон . . . . .	0,02	2,3	110
Пиридин-2-альдоксимметйодид . . .	0,00014	0,65	4700
Пиридин-4-альдоксимметйодид . . .	0,0031	0,76	240

### Строение реактиваторов

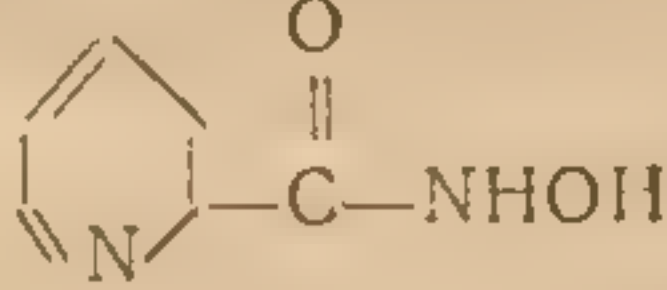
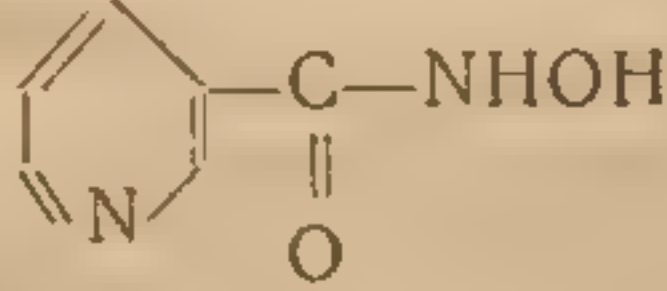
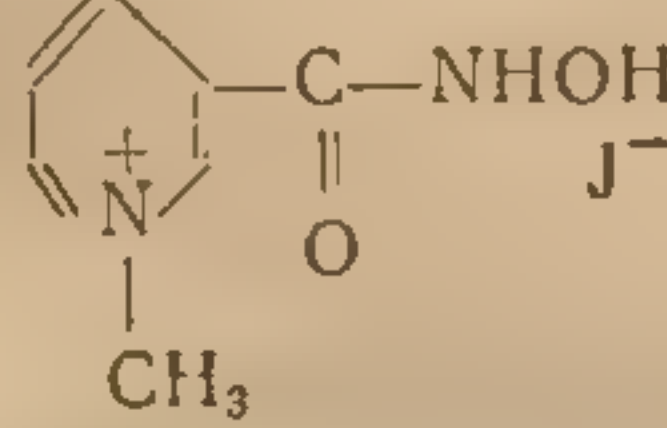
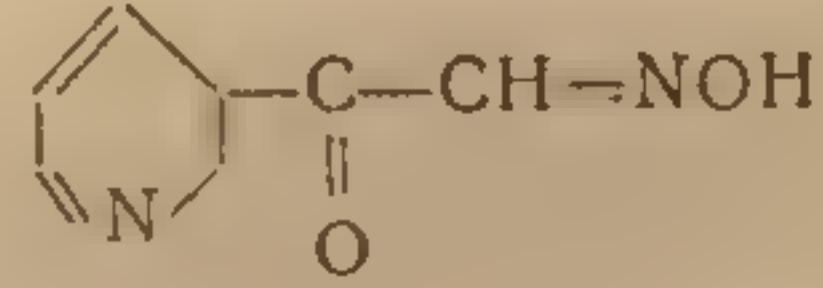
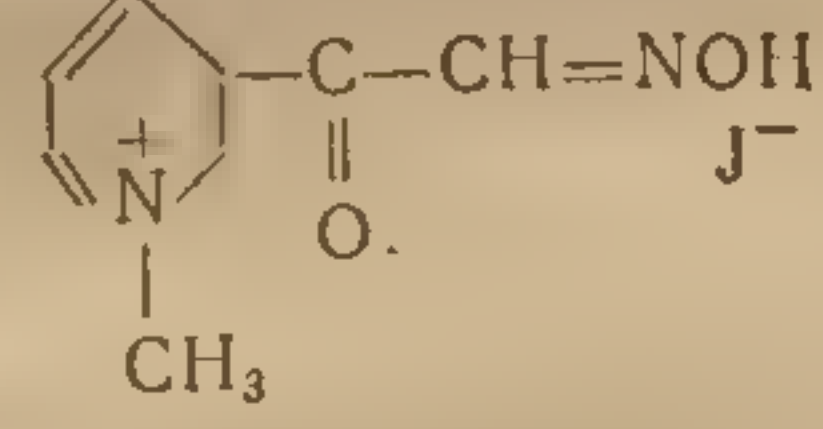

В табл. 16 перечислены некоторые реактиваторы холинэстеразы, представляющие наибольший теоретический и практический интерес. В таблице приведены значения рК реактиватора и псевдобимолекулярной константы скорости реакции реактивирования. Эта константа отражает реальную скорость реактивации и учитывает общую концентрацию реактиватора без поправки на количество анионной формы при данном рН.

Из таблицы видно, что оксимы обладают значительно более высокой реактивирующей способностью, чем гидроксамовые

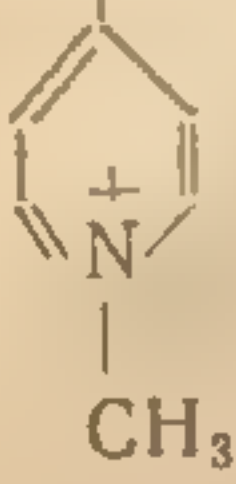



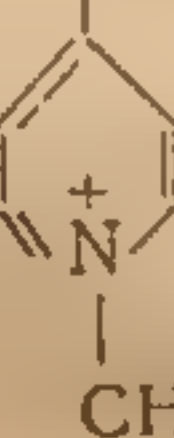


Таблица 16

Строение и реактивирующая активность некоторых оксимов  
( $k$ -бимолекулярная константа скорости реактивации  
диэтоксифосфорилированной истинной холинэстеразы). — Heath, 1961

Название	Строение	pK	$k$
Моноизонитрозоацетон (МИНА)	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{NOH}$	8,3	7,0
Диизонитрозоацетон (ДИНА)	$\text{HON}=\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{NOH}$	7,5	8,4
Диацетилмоноксим (ДАМ)	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$ $\text{O} \quad \text{NOH}$	9,3	0,1
Изонитрозоацетофенон	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{NOH}$	8,25	10,7
Пиколингидроксамовая кислота		8,5	2,9
Никотингидроксамовая кислота		8,4	0,01
Подметилат никотингидроксамовой кислоты		6,5	0,3
Никотинилформальдоксим		7,8	80
Подметилат никотинилформальдоксима		7,2	2800
Изоникотинилформальдоксим	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{NOH}$ 	7,8	21



Название	Строение	pK	K
Йодметилат изоникотинилформальдоксима	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{NOH}$  $\text{J}^-$	7,1	2 500
Пиридин-2-альдоксим	 $\text{CH}=\text{NOH}$	10,1	0,34
Йодметилат пиридин-2-альдоксима (2ПАМ)	 $\text{J}^-$	8,0	20 000 *
Пиридин-4-альдоксим	$\text{CH}=\text{NOH}$ 	10,2	0,80
Йодметилат пиридин-4-альдоксима (4ПАМ)	$\text{CH}=\text{NOH}$  $\text{J}^-$	8,3	1400
Холин	$(\text{CH}_3)_3 \text{N}^+ \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{OH}$	12	0,1
Диметиламиноэтанол	$(\text{CH}_3)_2 \text{NCH}_2 \text{CH}_2 \text{OH}$	12	0,001

\* Это необычно высокое значение, отличающееся от величины, приведенной в табл. 15, было получено на истинной холинэстеразе электрического угря (Wilson, Ginsburg, Quan, 1958).

кислоты. Йодметилирование азота пиридинового ядра, т. е. введение в молекулу реактиватора положительного заряда, как правило, очень резко увеличивает скорость реактивации. Степень этого увеличения оказалась очень различной в разных случаях: при йодметилировании никотингидроксамовой кислоты скорость увеличилась в 30 раз, в случае изоникотинилформальдоксима — более чем в 100 раз, в случае пиридин-2-альдокси-



ма — почти в 60 000 раз. Для сравнения в таблице приведен холин, который тоже обладает выраженным, хотя и слабым, реактивирующим действием. Его третичный аналог — диметиламиноэтанол — практически совершенно лишен реактивирующих свойств.

Дальнейшие изыскания новых еще более мощных реактиваторов холинэстеразы пошли по пути создания бис-пиридиновых соединений, содержащих две пиридиновые альдоксимные группы, связанные между собой полиметиленовым мостиком и расположенные на разном расстоянии друг от друга. Синтез и исследование этих веществ были осуществлены независимо друг от друга, разными группами авторов (Hobbiger et al., 1958; Pozio-mek et al., 1958; Wilson, Ginsburg, 1958; Hobbiger, Sadler, 1959; Berry et al., 1959).

Строение и относительная реактивирующая активность некоторых из этих соединений приведены в табл. 17, из которой видно, что наибольшей активностью обладает соединение ТМБ-4, представляющее собой 1,3-бис(N-пиридиновый-4-альдоксим)-пропандибромид.

Кинетика реактивации холинэстеразы под действием ТМБ-4 и близких к нему бис-четвертичных соединений отличается от картины, наблюдаемой при использовании других реактиваторов. Процесс носит выраженный двухфазный характер: вначале в течение короткого отрезка времени происходит очень быстрое восстановление активности фермента, а затем реакция практически прекращается или прирост активности происходит чрезвычайно медленно. Скейф (Scaife, 1959) объясняет это наступлением равновесия реакции в связи с образованием стабильного фосфорилированного оксима.

Сопоставление структуры соединений, представленных в табл. 17, показывает, что максимальной активностью обладают вещества, у которых пиридиновые кольца находятся на расстоянии 3—5 метиленовых групп друг от друга. Уменьшение этого расстояния до одной метиленовой группы или увеличение его до 10 сопровождается заметным снижением реактивирующих свойств. Второй важный вывод состоит в том, что в реакцию с фосфорилированным ферментом вступает, по-видимому, только одна из двух имеющихся оксимных групп, так как соединения, содержащие одну оксимную группу (последние два вещества в табл. 17), тоже являются значительно более мощными реактиваторами, чем 2ПАМ. Возможно, что второе пиридиновое кольцо, расположенное на определенном расстоянии от первого, увеличивает прочность комплекса между реактиватором и угнетенным ферментом.

В самое последнее время появилось сообщение (Engelhard, Erdmann, 1963) о создании нового реактиватора холинэстеразы, еще более эффективного, чем ТМБ-4.



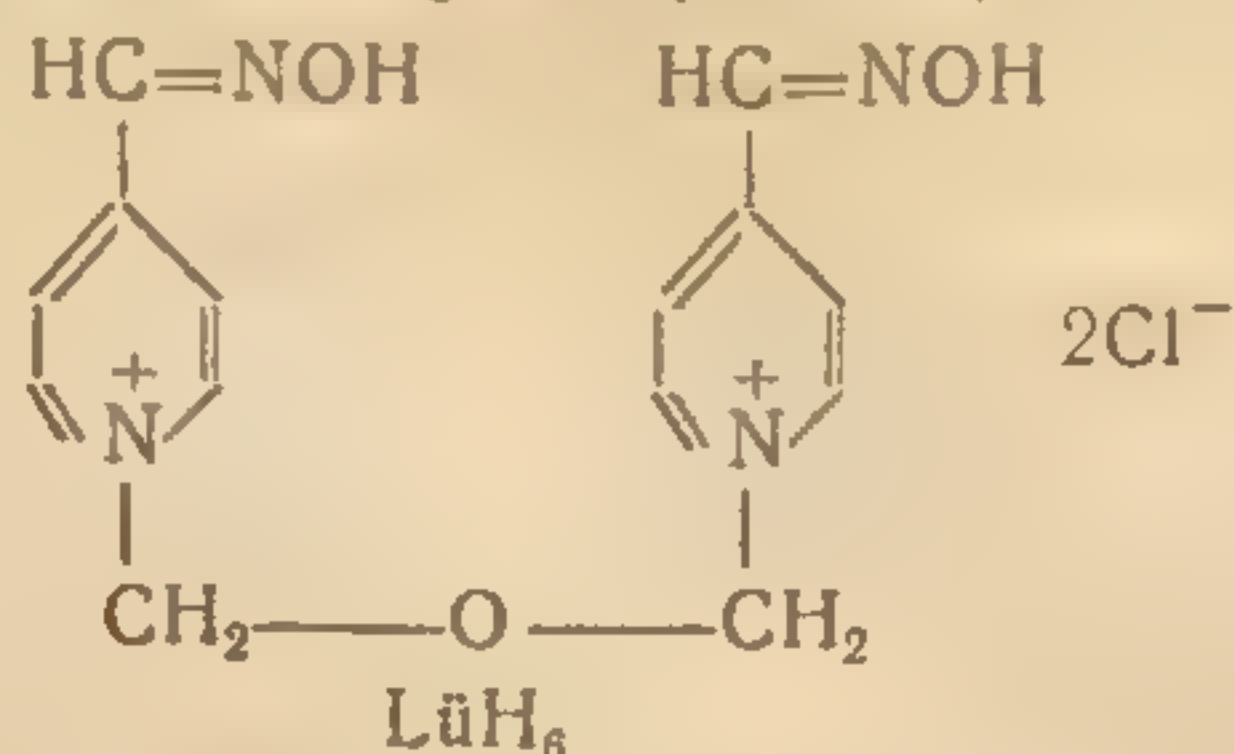
Таблица 17

Сравнительная реактивирующая активность некоторых бис-пиридиновых соединений (реактивация диэтоксифосфорилированной истинной холинэстеразы при pH—7,4 и 37°; реактивирующая способность ПАМ принята за единицу). — По данным разных авторов

Соединение	Относительная скорость реактивации
$\text{HON}=\text{CH}-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+-(\text{CH}_2)_5-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+-\text{CH}=\text{NOH}$	2
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -\text{CH}_2- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array}$	3
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -(\text{CH}_2)_3- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} \quad (\text{ТБМ-4})$	22
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -(\text{CH}_2)_5- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array}$	16
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -(\text{CH}_2)_{10}- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array}$	2
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -(\text{CH}_2)_3- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array}$	8
$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array} -(\text{CH}_2)_5- \begin{array}{c} \text{CH}=\text{NOH} \\   \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+ \end{array}$	7



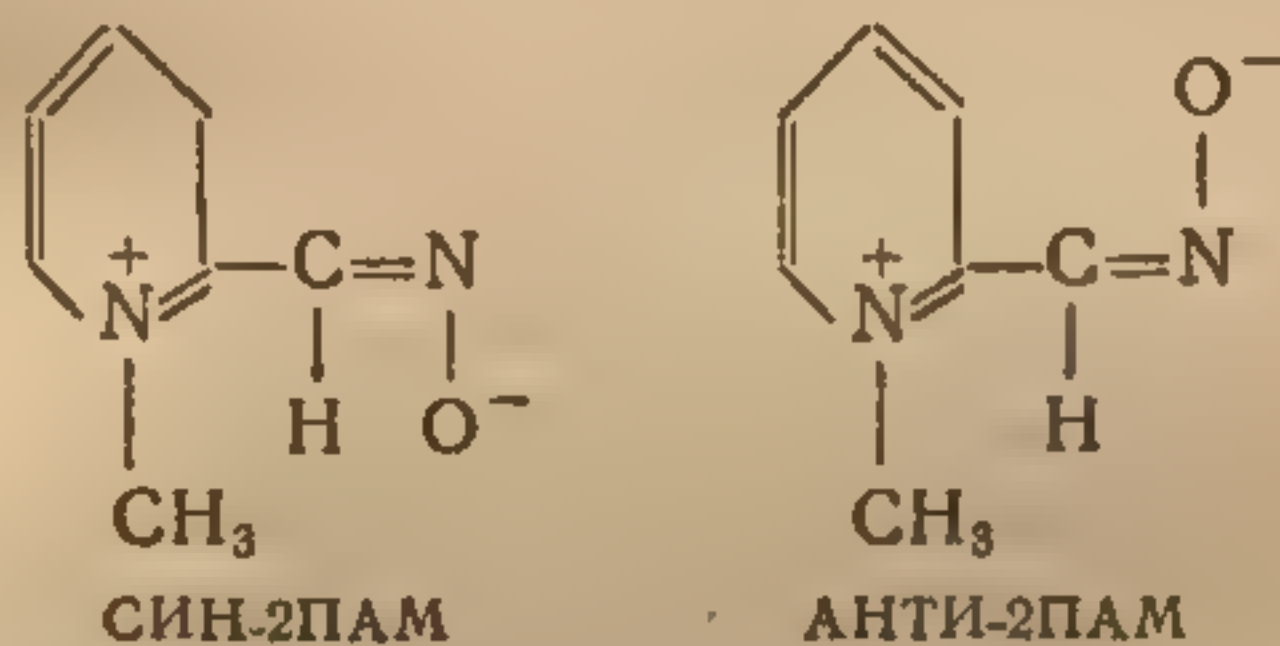
Этим соединением оказался бис-[4-оксиминометилпиридиний-(1)]-метилловый эфир-дихлорид (LüH-6).



На примере истинной холинэстеразы, угнетенной ДФФ и фосфаколом, было показано, что LüH-6 является в два раза более мощным реактиватором, чем ТМБ-4.

### О гипотезе «молекулярной комплементарности»

Вильсон и сотр. (Wilson, Ginsburg, Quan, 1958; Wilson, 1959) опубликовали серию исследований, посвященных детальному изучению реактивирующих свойств изомеров йодметилата пиридинальдоксима (ПАМ). При рассмотрении структуры, например, 2ПАМ видно, что благодаря наличию двойной связи в боковой цепи его молекулы он может существовать в виде двух геометрических изомеров: син-2-ПАМ и анти-2-ПАМ. Активным реактиватором оказался только анти-изомер. Вильсон объясняет это различие тем, что оба изомера обладают различной «молекулярной комплементарностью» по отношению к фосфорилированному ферменту.



Он предполагает, что при образовании комплекса между реактиватором и угнетенным ферментом положительно заряженный атом азота пиридина прочно закрепляется на анионном центре, и тогда для того, чтобы произошла реактивация, необходимо, чтобы нуклеофильный кислород оксима был расположен в непосредственной близости к атому фосфора фосфорильной группы. Непрямым путем были определены координаты этого атома, и расчеты показали, что благоприятное расположение может существовать только у анти-изомера, но не у син-изомера. В соответствии с этим только анти-изомер 2ПАМ обладает реактивирующими свойствами. Эти же рассуждения



применимы к 4ПАМ, тогда как 3ПАМ, который является очень плохим реактиватором, по данным Вильсона, ни в син-, ни в анти-форме не может обладать нужным расположением атомов, чтобы обеспечить необходимую молекулярную комплементарность.

Эта стройная гипотеза была несколько поколеблена недавними исследованиями Пожиолека и сотрудников (Poziomek et al., 1961a), которые показали, что препарат, выделенный Вильсоном, представлял собой не син-2ПАМ, а был карбиноламином, т. е. вместо оксимной группы  $—CH=N—OH$  (как считал Вильсон) фактически содержал группу  $—CH(OH)NHOH$ . Что же касается син- и анти-изомеров 2ПАМ, то оказалось, что они не существуют в форме стабильных веществ, а легко переходят друг в друга и не могут быть получены отдельно.

В дальнейшем тем же авторам (Poziomek et al., 1961b) удалось синтезировать отдельно син- и анти-изомеры 4ПАМ. Их конфигурация была установлена с помощью спектров ядерного магнитного резонанса. Определение реактивирующей активности этих соединений производилось на истинной холинэстеразе, угнетенной заринном. В полном противоречии с гипотезой Вильсона син-изомер 4ПАМ оказался почти в три раза более эффективным реактиватором, чем анти-изомер.

#### Зависимость реактивации от природы ингибитора и фермента

Скорость реактивации определяется не только строением реактиватора. Она в очень большой степени зависит от природы ингибитора, точнее — от структуры фосфорильного остатка, присоединяющегося к ферменту в процессе угнетения. При сравнении скорости реактивации диэтокси- и диизопропоксифосфорилированной холинэстеразы оказалось, что все реактиваторы легче восстанавливают активность диэтоксифосфорилфермента (Wilson, Ginsburg, 1955a; Hobbiger, 1956; С. М. Марков и др., 1962). При этом была установлена интересная зависимость: реактиваторы, не содержащие четвертичного атома азота (МИНА, ДИНА, никотингидроксамовая кислота, пиколингидроксамовая кислота и др.), реактивировали диэтоксифосфорилфермент в 5—10 раз быстрее, чем диизопропоксифосфорилфермент. Что же касается реактиваторов, имеющих положительно заряженный атом азота, то у них это различие было выражено гораздо больше — скорость реактивации диэтоксифосфорилфермента была в 50—100 раз выше (Wilson, 1955; Davies, Green, 1956). Эту особенность можно объяснить тем, что объемистые изопропильные радикалы в диизопропоксифосфорилферменте стерически препятствуют подходу положительно заряженного атома азота к анионному центру. В то же время наличие только одной изопропильной группы в угнетенном ферменте не мешает



реактивации: угнетенная заринном холинэстераза, у которой фосфорильная группа содержит один изопропокси- и один метильный радикал  $[i-C_3H_7O(CH_3)P(O)-]$ , очень легко реактивируется всеми реактиваторами.

С большим трудом протекает реактивация холинэстеразы, угнетенной мипафоксом или шраданом (Kewitz, 1957). Подавляющее большинство реактиваторов практически неспособно восстановить активность холинэстеразы, угнетенной табуном (Wilson, Sondheimer, 1957). Однако ТМБ-4 при использовании его в достаточно высокой концентрации заметно реактивирует как истинную, так и ложную холинэстеразу, угнетенную табуном (Flieischer et al., 1960; Heilbronn, 1963). Энандер (Enander, 1958) исследовал реактивацию холинэстеразы эритроцитов после угнетения различными ФОС, содержащими в своей молекуле остаток холина (метилфторфосфорилхолин, метилфторфосфорилгомохолин, метилфторфосфорил- $\beta$ -метилхолин). Ни один из изученных им реактиваторов (2ПАМ, йодмстиллат никотингидроксамовой кислоты, ДИНА, ДАМ) совершенно не реактивировал фермент, угнетенный этими ядами. Энандер предполагает, что исследованные им ФОС в процессе угнетения холинэстеразы образуют дополнительную связь с ферментом за счет четвертичного атома азота холина, который соединяется с аннионным центром. Это обеспечивает более прочное соединение фермента с ингибитором и препятствует воздействию реактиваторов.

Реактивация зависит и от типа фермента. При использовании различных ингибиторов и реактиваторов было показано, что во всех случаях истинная холинэстераза реактивируется легче, чем ложная (Scaife, 1959). Оказалось, что химотрипсин, угнетенный ФОС, тоже может быть реактивирован самыми различными оксимами и гидроксамовыми кислотами. Этот процесс протекает несколько медленнее, чем в случае реактивирования холинэстеразы, но подчиняется тем же кинетическим закономерностям (Green, Nichols, 1959; Cohen, Erlanger, 1960).

#### УТРАТА СПОСОБНОСТИ К РЕАКТИВАЦИИ

Продолжительность контакта фермента с ингибитором играет важную, а иногда даже определяющую роль в процессе реактивирования. Хоббигер (Hobbiger, 1956) показал, что восстановление активности очищенной холинэстеразы эритроцитов, угнетенной различными ФОС, происходило достаточно полно только тогда, когда предварительное взаимодействие фермента с ФОС продолжалось не более 20 мин. С удлинением продолжительности контакта реактивирующая способность 2ПАМ и других реактиваторов ослабевала. Аналогичный эффект наблюдался в опытах *in vivo* в крови, взятой у кроликов через 4 ч



после введения ДФФ; добавление 2ПАМ приводило к отчетливому реактивированию холинэстеразы, в то время как фермент крови, полученной через 24 ч, не поддавался реактивированию.

По данным Дэйвиса и Грина (Davies, Green, 1956), хранение холинэстеразы, угнетенной заринном, в течение нескольких часов при 37° приводит к резко выраженному снижению способности моноизонитрозоацетона реактивировать фермент. Аналогичные данные были получены для холинэстеразы плазмы, угнетенной ДФФ (Hobbiger, 1955).

Это явление получило название «старение» угнетенной холинэстеразы. Было показано, что доля фермента, способного к реактивации, экспоненциально уменьшается во времени, т. е. процесс старения протекает по кинетике первого порядка. При повышении температуры и при сдвиге реакции среды в кислую сторону скорость старения быстро увеличивается. Все это свидетельствует о том, что утрата способности к реактивации представляет собой химическую реакцию.

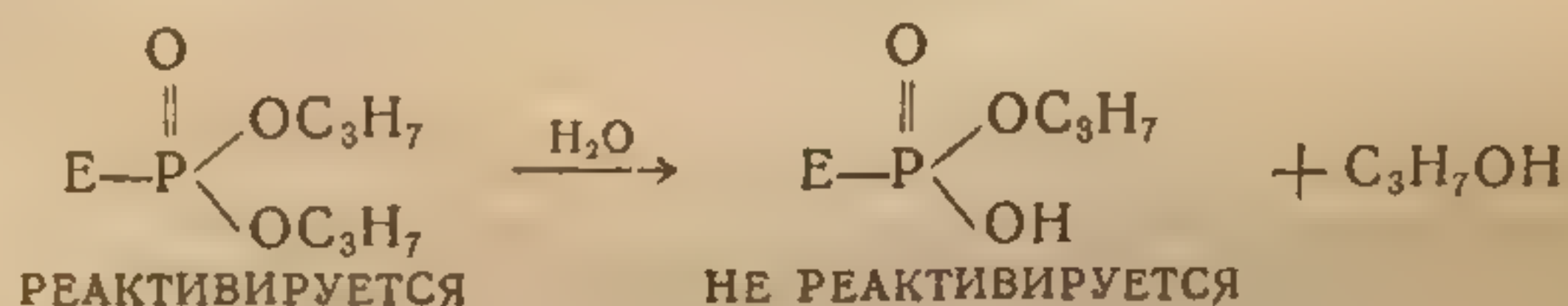
Скорость процесса старения в большой степени зависит как от природы ингибитора, так и от типа фермента. Холинэстераза, угнетенная ДФФ, как правило, быстрее утрачивает способность к реактивации, чем фермент, угнетенный фосфаколом или другим ФОС, содержащим диэтоксифосфорильную группу. По данным Г. С. Янса и др. (1962), существуют значительные различия в скорости старения после угнетения ДФФ и заринном. Так, холинэстераза сыворотки, угнетенная ДФФ, уже после 8 ч хранения при 25° восстанавливала свою активность под действием 2ПАМ только на 26%. В тех же условиях хранения фермент, угнетенный заринном, даже через 120 ч на 50% сохранял способность к реактивации. При использовании разных ингибиторов было показано, что процесс старения ложной холинэстеразы происходит приблизительно в 10 раз быстрее, чем истинной (Hobbiger, 1955). По данным Коэна и Эрлангера (Cohen, Erlanger, 1960), химотрипсин, угнетенный фосфаколом, совсем лишен способности стареть даже при длительном хранении.

Интересное наблюдение недавно сделала Хейльброн (Heilbronn, 1963). Исследуя реактивацию холинэстеразы сыворотки, угнетенной табуном, она установила, что очищенный фермент утрачивает способность к реактивации гораздо медленнее (более чем в 10 раз), чем исходная плазма человека или лошади. Возможно, это объясняется тем, что в цельной плазме содержится фактор, ускоряющий старение, так как прибавление прокипяченной и центрифугированной плазмы к очищенным препаратам ускоряло их последующее старение. Правда, этот фактор был более выражен в плазме человека, чем в плазме лошади, хотя очистка в равной степени замедляла старение холинэстеразы из этих двух источников.



Первоначально механизм утраты способности к реактивации объясняли тем, что при хранении угнетенного фермента происходит трансфосфорилирование — перенос фосфорильного остатка с участка, где он связан лабильно (возможно, с имидазола), на серин, где он связывается настолько прочно, что отщепление его становится невозможным даже под действием нуклеофильных реагентов. В дальнейшем, когда стало известно, что никакого промежуточного фосфорилирования имидазола не происходит, а фосфорильная группа сразу присоединяется к остатку серина (так же как ацетильная группа в ходе гидролиза ацетилхолина), от этого представления пришлось отказаться.

В 1959 г. голландские исследователи (Berends et al., 1959; Cohen et al., 1959) предложили другую гипотезу, объясняющую механизм старения. Авторы угнетали холинэстеразу сыворотки ДФФ, меченым  $P^{32}$  и хранили угнетенный фермент в определенных условиях. Через различные промежутки времени они определяли способность фермента к реактивации и одновременно те же порции фермента подвергали пептическому перевариванию с последующим анализом тех пептидов, которые содержали меченый фосфор. В первые минуты после угнетения, как и следовало ожидать, весь меченый фосфор находился в составе диизопропилфосфорилированных пептидов, однако, по мере хранения, часть фосфора начинала обнаруживаться в форме моноизопропилфосфорильной группы, причем доля  $P^{32}$ , находящегося в этой форме, всегда соответствовала той доле фермента, которая уже не могла быть реактивирована. Был сделан вывод, что процесс старения состоит в деалкилировании фосфорильной группы, в превращении диизопропилфосфорилфермента, способного к реактивации, в стабильный, неактивируемый моноизопропилфосфорилфермент:

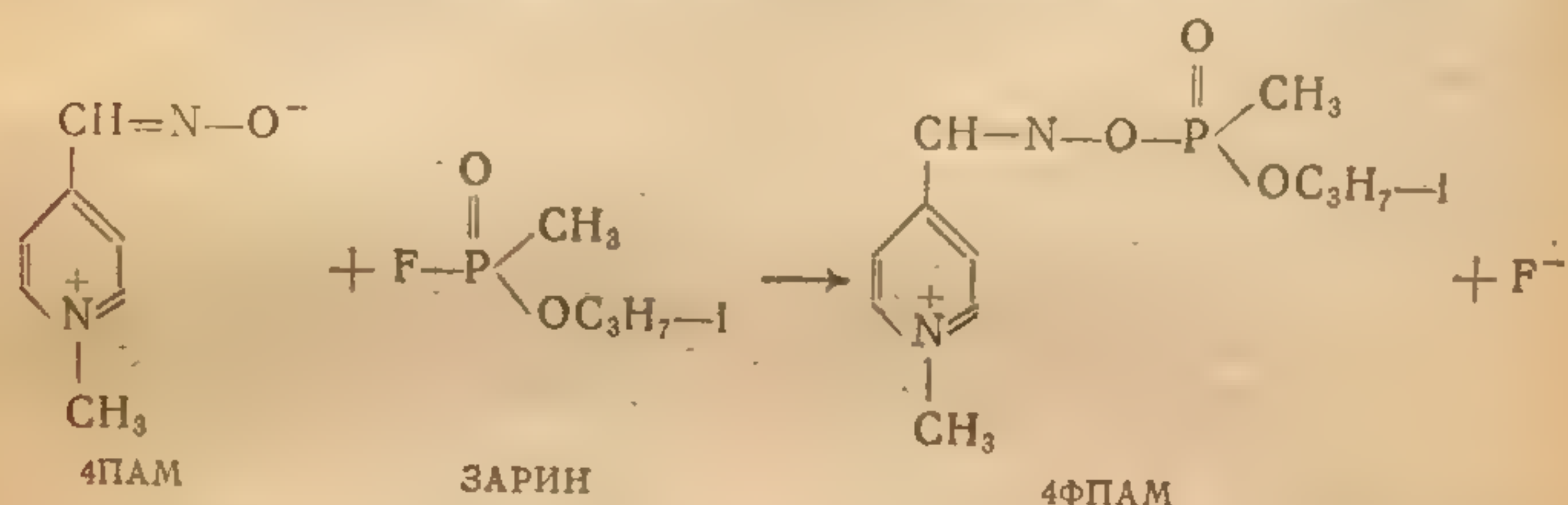


Этот вывод был подтвержден в опытах с ДФФ, который был мечен одновременно  $P^{32}$  и  $C^{14}$ . По мере старения содержание  $P^{32}$  в ферментном белке сохранялось постоянным, а содержание  $C^{14}$  постепенно снижалось, причем в надосадочной жидкости обнаруживался изопропанол- $C^{14}$ . В дальнейшем было установлено, что и при угнетении холинэстеразы сыворотки заринном —  $P^{32}$  старение происходит по такому же механизму (Г. С. Янс и др., 1962).

Заканчивая главу о реактиваторах холинэстеразы, необходимо упомянуть об одном наблюдении, которое вскрывает новые и неожиданные свойства реактиваторов. Оказалось, что в



некоторых случаях реактиваторы способны реагировать с ФОС с образованием сравнительно стойких фосфорилированных продуктов, которые обладают не меньшей, а иногда даже более выраженной антихолинэстеразной активностью, чем исходные ФОС. Так, оказалось, что при взаимодействии 4ПАМ с зарин образуется вещество, названное авторами 4ФПАМ, которое имеет в водном растворе при  $\text{pH} = 7,6$  период полураспада около 700 мин и обладает в 1,4 раза более мощным антихолинэстеражным действием, чем зарин (Hackley et al., 1959).



В случае взаимодействия с зарин 2ПАМ образующийся продукт оказался менее стойким — он имел период полураспада 15—30 мин. При обычно применяемых концентрациях эффект такого превращения невелик, однако в ряде случаев с его возможностью нужно считаться.

Мы рассмотрели в этой главе некоторые общие свойства реактиваторов холинэстеразы и механизм их действия на угнетенный фермент. Способность многих веществ, особенно из класса оксимов, быстро и полно восстанавливать активность холинэстеразы, утраченную под действием ФОС, была использована в работах по профилактике и терапии отравлений этими ядами. При этом было установлено, что некоторые реактиваторы обладают выраженным антидотным эффектом при отравлении ФОС животных и человека. Более подробные данные об использовании реактиваторов в качестве антидотов ФОС приведены в разделе «Экспериментальная терапия».

## ПРЕВРАЩЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ВЫВЕДЕНИЕ ФОС

В изучении механизма токсического действия ядов важное место должно принадлежать исследованию судьбы ядов в организме — скорости их всасывания, характера распределения, длительности пребывания в органах, путей выведения, особенностей взаимодействия с различными биохимическими субстратами тканей и т. д. Решение всех этих вопросов в отношении ФОС



связано с необходимостью определения ничтожно малых концентраций яда в биологических объектах. Серьезные методические трудности, возникающие при этом, до последнего времени мешали успешному разрешению задачи.

Серьезным шагом вперед в разрешении этой проблемы явилось применение метода радиоактивных индикаторов.

Яндорф и Мак-Намара (Jandorf, McNamara, 1950) исследовали распределение радиоактивного фосфора после введения кроликам меченого ДФФ. Опыты показали, что в почках, печени, легких и плазме определяются значительные концентрации  $P^{32}$ , в то время как в остальных органах, в том числе и в головном мозгу, содержание радиофосфора очень невелико. Аналогичные результаты получил Утияма (Uchiyama, 1959). После внутривенного или внутрибрюшинного введения кроликам зарина- $P^{32}$  содержание  $P^{32}$  в легких было выше, чем в других органах. С увеличением времени после введения яда содержание  $P^{32}$  в крови снижалось быстрее, чем в тканях (McPhail, Adie, 1960).

При накожном нанесении паратиона —  $P^{32}$  человеку, кошке, кролику и крысе радиоактивность накапливалась в значительном количестве только в поверхностных слоях кожи. Наибольшие количества  $P^{32}$  были обнаружены в волосяных фолликулах и в сальных железах. Всасывание паратиона и фосфакола через кожу происходило чрезвычайно медленно — не более чем 5  $\mu$ молей в минуту на 1  $см^2$ . Зарин всасывался в 25 раз быстрее (Fredriksson и др., 1961а, б; 1962). После накожного нанесения меченого паратиона мышам вещество обнаруживалось в различных органах и тканях. Наибольшая радиоактивность была обнаружена в слюнных железах и в жировых тканях шеи. Значительное количество  $P^{32}$  было найдено в стенках желудка и кишечника, щитовидной железе, селезенке и легких. В мышцах и центральной нервной системе содержалась небольшая радиоактивность (Fredriksson, Bigelow, 1961). После введения крысам меченого вещества Байер-29493, близкого по строению к метилпаратиону, накопление радиоактивности отмечалось в печени, почках и, в несколько меньшей степени, в костях (Waddy, Arthur, 1961).

К. А. Гар, Н. А. Сазонова и Ю. Н. Фадеев (1955а, б) использовали в своей работе тиофос (паратион) и метафос (метилпаратион), меченные радиоактивным фосфором. Было обнаружено, что после введения этих препаратов в кровь кроликам происходит настолько быстрое их разрушение, что в случае применения тиофоса, например, уже через 1—2 мин 30—40% содержащегося в крови  $P^{32}$  относилось к продуктам гидролиза препарата, растворимым в воде. Было отмечено также быстрое выведение препаратов из организма. Метафос разрушался



несколько медленнее (полный распад происходил к исходу первых суток).

Быстрое разрушение тиофоса в организме животных и человека было подтверждено Эйкеном (Eicken, 1954), который показал, что после введения тиофоса в моче очень быстро появляется продукт его гидролиза — п-нитрофенол. Выделение п-нитрофенола обычно заканчивалось в течение первых суток. Коэн и Варринга (Cohen, Warringa, 1954) внутримышечно вводили людям, с целью лечения глаукомы, ДФФ, меченный  $P^{32}$ , в нетоксических дозах. Максимальное содержание препарата в крови было зарегистрировано через 90 мин. Значительная часть  $P^{32}$  прочно связывалась с белками крови и органов, а часть препарата подвергалась гидролитическому разложению. Выведение  $P^{32}$  из организма осуществлялось преимущественно почками: за 10 дней с мочой было выделено 60—70% введенной радиоактивности. С калом за этот же период выделилось лишь 5%  $P^{32}$ . Необходимо подчеркнуть, что относительно быстро покидал организм только тот  $P^{32}$ , который входил в состав продуктов гидролиза. Фосфор, связанный с белками плазмы и эритроцитов, исчезал из крови со скоростью, соответствующей скорости обновления составных частей крови. Важно отметить, что как в эритроцитах (Michel, 1953), так и в сыворотке (Goutier, 1956) большая часть ДФФ, меченого радиоактивным фосфором, связывается с белком неспецифической эстеразы, а не холинэстеразы. В то же время связь меченого ДФФ с холинэстеразой сыворотки оказалась более прочной, чем с другими белковыми фракциями (Cohen, Warringa, 1957).

Способность ФОС быстро и прочно связываться с белками тканей определяет некоторые важные особенности распределения ФОС в организме, так как благодаря этой способности фосфорорганические вещества накапливаются преимущественно в том органе, который оказывается первым на их пути. Поэтому характер распределения ФОС в значительной мере зависит от способа их введения в организм. Это очень ярко продемонстрировали Априсон и др. (Aprison et al., 1954), которые вводили ДФФ в правую сонную артерию кроликам и определяли активность холинэстеразы в различных отделах мозга. Оказалось, что в соответствии с неравномерным распределением ДФФ, активность фермента была значительно более угнетена в правом полушарии. Поведение животных (кружение на месте в одну сторону) также свидетельствовало об асимметричном нарушении функции центральной нервной системы. Аналогичные данные получил Уайт (White, 1956). Пользуясь специальным микрометрическим шприцем, соединенным со стереотаксическим аппаратом, он вводил ДФФ непосредственно в правое хвостатое ядро мозга кроликов и показал, что при умеренных дозах яда (до 0,16 мг) ДФФ практически не распространялся за пре-



делы хвостатого ядра. Активность холинэстеразы в других отделах мозга почти не снижалась.

Особенности распределения ФОС в организме, в частности их способность проникать через гемато-энцефалический барьер, в значительной степени зависят от химического строения и в первую очередь от наличия свободного электрического заряда в их молекуле. С большой убедительностью было показано, что как аммониевые (Koelle, 1956), так и сульфониевые (Я. С. Смуслин, 1957, 1958; Э. В. Зеймаль и др., 1962, 1963; Л. Г. Магазанник и И. В. Семенов, 1962; Vandekar, Heath, 1957) производные некоторых ФОС, обладающие высокой токсичностью и выраженным антихолинэстеразным действием *in vitro*, почти не угнетают холинэстеразу мозга при введении в кровь животным.

Скорость выделения ФОС и продуктов их гидролиза из организма в большой степени зависит не только от химического строения вещества, но также от пути введения яда, вида и пола животного. Эти зависимости были особенно убедительно показаны при использовании ФОС, меченных  $P^{32}$ . Так, оказалось, что после кожного нанесения кораля (вещество, близкое по строению к паратиону) крысам через сутки выделяется 3% введенной дозы, после подкожного введения — 11%, а после перорального — 40% (Krueger et al., 1959). После пероральной дачи крысам диметоата у самок через 5 суток выделилось 55%, а у самцов 90% (Dauterman et al., 1959). Выведение паратиона у крыс через сутки составляло 60%, а у коров через 5 суток только 13% (Ahmed et al., 1958).

### ДЕТОКСИКАЦИЯ ФОС

Еще на первых этапах изучения фосфорорганических ядов было отмечено, что некоторые ткани и биологические жидкости обладают способностью уменьшать их токсические свойства. Так, было установлено, что даже кратковременный контакт некоторых ФОС с плазмой или сывороткой крови приводит к быстрой детоксикации ядов.

При изучении природы детоксицирующего действия тканей внимание исследователей в первую очередь было привлечено к возможности ферментативного расщепления ФОС в организме. Мазур (Mazur, 1946) установил, что в тканях организма содержится специальный фермент, который катализирует гидролиз ДФФ по фторфосфорной связи, в результате чего отщепляется фтористоводородная кислота и ДФФ теряет токсические свойства. Мазур описал ряд свойств этого фермента, показал, что он не идентичен холинэстеразе, произвел частичную очистку его и дал ему название фосфофлюораза.

В дальнейшем появилось большое число исследований, с разных позиций трактующих вопрос о природе фермента, который



катализирует гидролиз ФОС. Олдридж (1953б) обнаружил в сыворотке фермент, гидролизующий фосфакол. На основании своих исследований автор пришел к заключению, что этот фермент идентичен ранее открытой им А-эстеразе сыворотки (Aldridge, 1953a), которая, в отличие от В-эстеразы, практически совершенно не чувствительна к инактивирующему действию фосфакола. Было показано, что неспецифическая А-эстераза Олдриджа активируется некоторыми хлорсодержащими инсектицидами. Этим можно было объяснить, что предварительное введение крысам алдрина (гексахлоргексагидродиметаннафталин) предотвращает токсическое действие паратиона (Ball, 1954; Crevier, 1958).

Моунтер и сотр. (Mounter et al., 1953) более детально исследовали фермент гидролиза ДФФ, описанный Мазуром. Им удалось получить высокоочищенные препараты фермента из почек, пользуясь методом фракционированного осаждения спиртом. Оптимум действия фермента лежал при  $pH = 7,5-8,0$ . В другой работе Моунтер (1954) подверг исследованию фермент сыворотки крови, способный гидролизовать фосфорорганические соединения. Этот фермент обладал способностью расщеплять ДФФ, ТЭПФ, фосфакол, а также п-нитрофенилацетат. Он оказался идентичным А-эстеразе Олдриджа.

Сравнение фермента сыворотки с описанным выше ферментом почек показало, что по свойствам они значительно отличаются друг от друга. Так, фермент почек выражено активировался  $Mn^{++}$  и  $Co^{++}$ , в то время как для фермента сыворотки эти ионы служили ингибиторами. Автор пришел к заключению, что в сыворотке и почках содержатся различные ферменты, катализирующие гидролиз ФОС. Разные авторы давали этим ферментам различные названия: ДФФ-аза, диалкилфторфосфатаза, фосфорилфосфатаза и др. Коэн и Варринга (Cohen, Warringa, 1957a) подвергли очистке фермент из почек свиньи. Им удалось получить гомогенную фракцию, удельная активность которой была в 100—150 раз выше активности исходного гомогената.

В дальнейшем Моунтер исследовал сравнительную способность фосфофлюоразы гидролизовать фосфорорганические вещества различного строения и показал, что фермент, содержащийся в почках млекопитающих (Mounter, Dien, 1956), а также в микроорганизмах (Mounter, Tuch, 1956), хорошо расщепляет диалкилфторфосфаты и тетраалкилпирофосфаты, но не действует на фосфакол и на паратион. Наряду с этим было установлено (Maly, Janok, 1956), что щелочная фосфатаза почек обладает способностью гидролизовать фосфакол с образованием п-нитрофенола.

Выраженными ингибиторами фермента оказались многие яды сульфгидрильных групп (п-хлормеркурбензоат, хлормеркурнитрат и др.). Напротив, сероводород активировал действие



фермента. Активность фермента резко повышалась в присутствии ионов марганца и в меньшей степени кобальта. В среде, содержащей  $Mn^{++}$ , многие азотистые соединения (производные пиридина) дополнительно активировали фермент.

Обстоятельная серия исследований о ферментативном гидролизе ФОС, в частности табуна, была выполнена Аугустинссоном и сотрудниками (Augustinsson, Heimbürger, 1954a, б, в; 1955a, б). Фермент, расщепляющий табун, был обнаружен во многих тканях и органах. Плазма крови отличалась наибольшей активностью, причем у разных животных она была различной: самой активной у кролика (в 10 раз активнее человеческой), наименее активной — у морской свинки. Фермент получил название табуназы или фосфорилфосфатазы, причем авторы отмечают, что он не относится ни к обычным фосфатазам, ни к холинэстеразе. Поше (Pochet, 1955) также показал наличие фермента, разрушающего табун, в сыворотке, печени и почках животных. Он предложил назвать этот фермент фосфоцианазой. Ионы фтора в концентрации  $1 \cdot 10^{-3} M$  на 54% подавляли ферментативный гидролиз табуна, но многие другие, в том числе  $[Mo(MoO_4)_6]^{6-}$ ,  $MoO_4^{2-}$ , и  $WO_4^{2-}$ , которые обладали выраженной способностью ускорять спонтанный гидролиз табуна, совершенно не влияли на его ферментативное разрушение табуназой (Augustinsson, 1958).

Хоскин и Трик (Hoskin, Trick, 1955) показали, что фермент сыворотки крыс расщепляет только правовращающий изомер табуна и не действует на левовращающий. По данным Аугустинссона (1957), табуназа почек и печени тоже обладает выраженной стереоспецифичностью.

В сыворотке крови и печени животных был обнаружен также фермент, расщепляющий зарин (Hoskin, 1956; Adie, Hoskin, Trick, 1956). Опытами, в которых субстратом действия этого фермента служил зарин, меченный  $P^{32}$ , было установлено, что единственным продуктом ферментативного гидролиза зарина является изопропилметилфосфиновая кислота, которая не обладает токсическими свойствами и не подвергается дальнейшим изменениям в организме крыс. Фермент был назван зариназой (Adie, 1954б). Интересно отметить, что не удалось установить зависимости между индивидуальной чувствительностью кроликов к зарину и активностью зариназы сыворотки или печени (Adie, 1954a).

Эйди (Adie, 1958) исследовал активность ферментов, гидролизующих табун и зарин, в сыворотке крови и 18 видах тканей у различных животных. Способность разрушать оба субстрата очень незначительно отличалась в различных случаях, из чего сделан вывод, что оба вещества гидролизуются одним и тем же ферментом или ферментами, чрезвычайно близкими по свойствам друг другу. Исследование внутриклеточной локализации

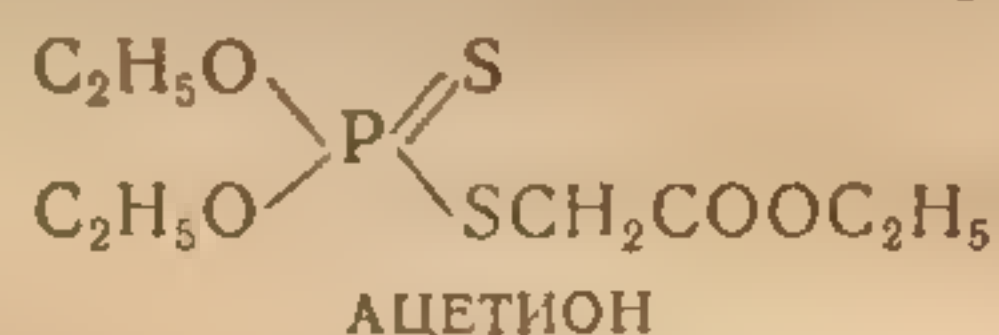


этих ферментов тоже показало, что они всегда встречаются вместе: больше всего их в надосадочной жидкости, несколько меньше в микросомах, еще меньше в митохондриях и совсем мало во фракции ядер (Adie, Tuba, 1958).

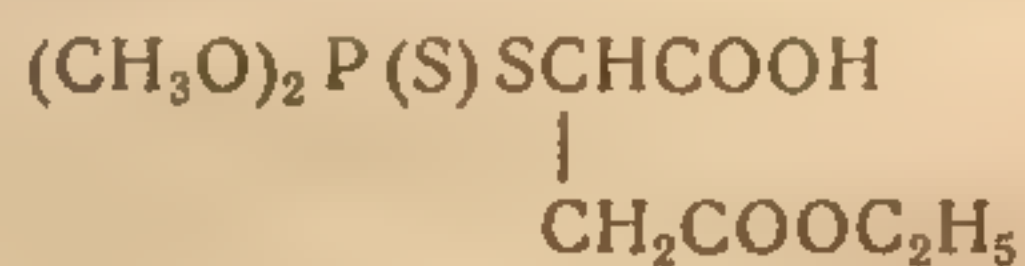
В отличие от этого, фермент, разрушающий 2,2-дихлорвинилдиметилфосфат, был локализован почти исключительно в надосадочной жидкости и во фракции митохондрий (Hodgson, Casida, 1962).

Биненфельд (Binenfeld, 1961, 1962а, б, в, г) подробно исследовал ферментативное разрушение армина в организме. Он показал, что «арминаза» содержится в плазме крови и органах многих видов животных и человека; она тормозится сравнительно высокими концентрациями SKF-525А (см. ниже), но совершенно не утрачивает своей активности под действием реактиваторов холинэстеразы 2ПАМ и ТМБ-4.

До сих пор речь шла о разрушении ФОС по связи между атомом фосфора и кислотной группой Х (см. схему на стр. 89). Однако известны инсектициды, которые помимо этой связи содержат в своей молекуле обычную сложноэфирную группу и их гидролитическая детоксикация осуществляется путем разрушения именно этой группы. К числу таких ФОС относятся малатион, ацетион, фосдрин (формулы малатиона и фосдрин приведены на стр. 102) и некоторые другие. Наиболее изучен ферментативный гидролиз малатиона. О'Брайн (O'Brien, 1957)



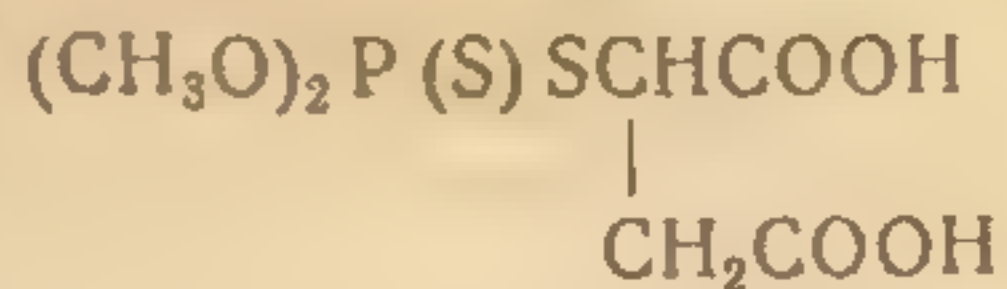
впервые показал, что  $\text{P} = \text{O}$  аналог малатиона (малаоксон) быстро разрушается тканями мышей, особенно печенью, почками и легкими. Многие ткани и сыворотка крови разных животных тоже обладали этой способностью (Murphy, DuBois, 1957). Кук и др. (Cook et al., 1958; Cook, Yip, 1958) исследовали разрушение малатиона гомогенатами печени и хроматографически разделяли образующиеся продукты. Им удалось показать, что при гидролизе разрушается одна сложноэфирная связь и образуется соответствующая монокислота:



Не удалось точно установить, какая из двух сложноэфирных групп,  $\alpha$  или  $\beta$ , подвергается разрушению. Фермент, гидролизующий малатион, был назван малатионазой. В дальнейшем с помощью радиоактивного малатиона было показано, что под действием малатионазы различных тканей из малатиона наряду с монокислотой может образовываться и дикислота — про-



дукт гидролитического разрушения обеих сложноэфирных групп (Seume, O'Brien, 1960).



Многие авторы (Cook et al., 1957; Cook, Yip, 1958; Rosenberg, Cook, 1958; Williams et al., 1958; Karczmar et al., 1962) наблюдали, что некоторые ФОС (ЭФН, диазинон, паратион, фосдрин и другие) выраженно потенцируют токсические эффекты малатиона. Оказалось, что этот эффект связан с тем, что перечисленные вещества подавляют активность малатионазы и тем самым препятствуют детоксикации малатиона в организме. Как правило, потенцирующая эффективность соединений коррелировала с их способностью угнетать малатионазу. В самое последнее время Касида и сотр. (1963) опубликовали исследование, в котором они изучили потенцирующее и антималатионазное действие 112 различных ФОС. Чрезвычайно высокой потенцирующей эффективностью обладали некоторые трифенилфосфаты: они снижали ЛД-50 малатиона с 1500 мг/кг до 50 мг/кг. Подобно малатиону происходит ферментативное разрушение и других ФОС, содержащих карбоксиэфирные группы (ацетион, фосдрин и др.).

#### АКТИВАЦИЯ ФОС

При попадании в организм ФОС могут подвергаться не только детоксикации путем гидролитического разрушения, но и активации, в результате чего их токсичность и антихолинэстеразная активность возрастают. Как правило, процессы активации связаны с окислением ФОС.

Уже давно было отмечено, что многие фосфотионаты (ФОС, содержащие в своем составе  $\text{P}=\text{S}$  группу), такие, как паратион, потазан, ацетион, систокс, малатион и другие, в чистом виде почти совершенно лишены антихолинэстеразной активности, но приобретают ее в организме животных или при инкубации с препаратами тканей. Активация тионатов легко осуществлялась срезами печени в атмосфере кислорода, но не протекала в анаэробной среде. Гомогенаты печени, в отличие от срезов были лишены способности активировать паратион и другие тионаты (Davison, 1955a). Добавление к гомогенатам ионов магния и дифосфопиридиннуклеотида восстанавливало их активную способность. Фермент, осуществляющий активацию, был сосредоточен во фракции микросом и в надосадочной жидкости, но каждая из этих фракций в отдельности проявляла лишь слабое действие, а в сочетании они были высоко эффективными. В некоторых случаях при более тщательном фракцио-



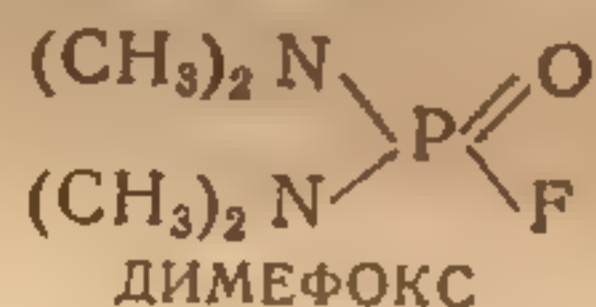
пировании удавалось получить такие препараты микросом, которые для проявления своего действия не нуждались в надоса- дочной жидкости (Murphy, Du Bois, 1957). В более поздних ис- следованиях О'Брайна (O'Brien et al., 1958; O'Brien, 1959) были изучены особенности активирования различных тионатов фер- ментной системой микросом печени.

В результате всех этих исследований было четко установлено, что активация тионатов состоит в их окислении, т. е. в превра- щении группы  $P = S$  в  $P = O$ . Образующиеся кислородные ана- логи фосфотионатов и являются теми соединениями, которые определяют их антихолинэстеразные свойства и токсичность.

Фермент, активирующий паратион и другие тионаты, угне- тается многими сульфгидрильными ядрами (йодацетамид, хлор- пикрин); веществами, разобщающими окислительное фосфори- лирование (2,4-динитрофенол); соединениями, связывающими карбонильные группы (гидразиды, гидроксиламины), и др. (Da- vison, 1955).

У самцов активность этого фермента оказалась выше, чем у самок. Кастрация самцов сопровождалась снижением активнос- ти, а введение самкам тестостерона повышало активность фермента (Murphy, Du Bois, 1958). Превращение паратиона мо- жет происходить не только в печени, но и в других тканях, од- нако в печени этот процесс происходит наиболее интенсивно, и расчеты показывают, что в организме крыс около 65% всего подвергающегося обмену паратиона окисляется именно в пе- чени (Kubišтова, 1959).

Кроме фосфотионатов, известна еще одна группа ФОС, при- обретающих антихолинэстеразные и токсические свойства толь- ко в организме. Это так называемые фосфорамидаты, главными представителями которых являются шрадан — октаметил (см. формулу на стр. 96) — и димефокс.

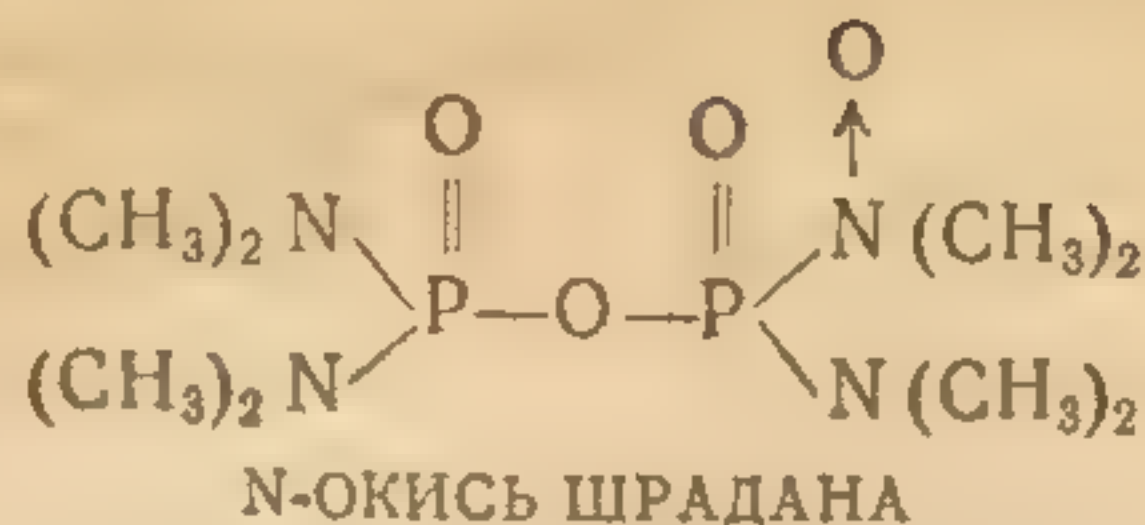


Еще в 1950 г. две группы исследователей независимо друг от друга установили, что как в организме животных, так и под дей- ствием срезов печени шрадан превращается в мощное антихо- линэстеразное вещество (Gardiner, Kilby, 1950; Du Bois et al., 1950). В дальнейшем большое число исследователей занима- лось изучением механизма этого превращения и выяснением свойств ферментной системы, катализирующей этот процесс (Fleisher, Jandorf, 1952; Casida et al., 1954; Heath et al., 1955; O'Brien, Spencer, 1955; O'Brien, 1956, 1957; Fenwick, 1957; Fen- wick et al., 1958).

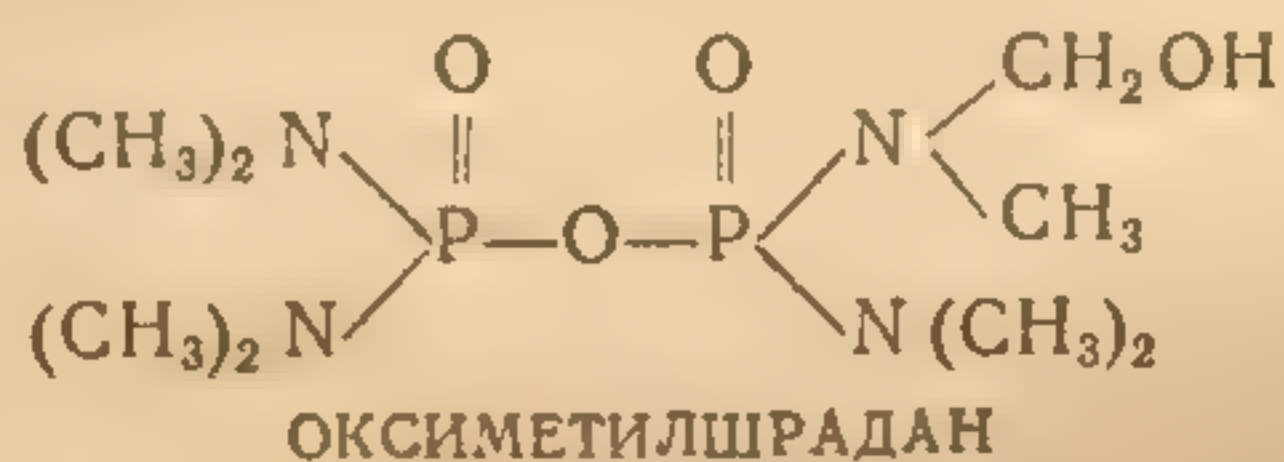
Первоначально предполагали, что активным метаболитом является N-окись шрадана, образующаяся в результате окис-



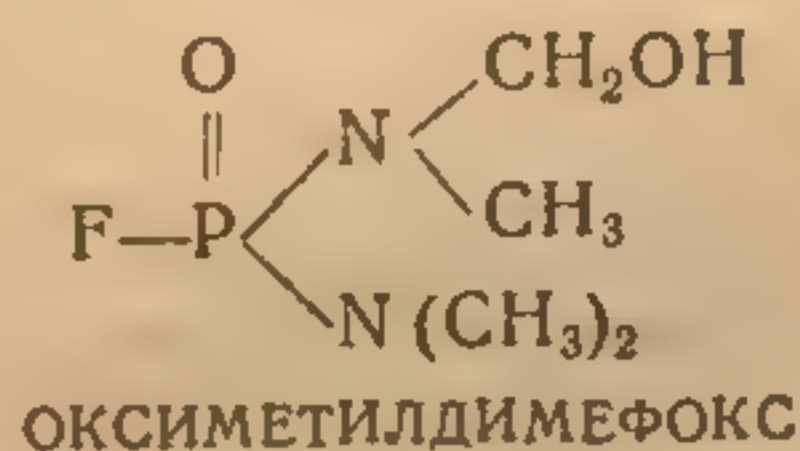
ления одного из атомов азота



Однако в дальнейшем в результате хроматографических и спектрографических исследований было установлено, что токсичный продукт превращения шрадана, обладающий мощным антихолинэстеразным действием, представляет собой не N-окись, а изомерный ей оксиметилшрадан, который образуется в организме, возможно, через стадию N-окиси.

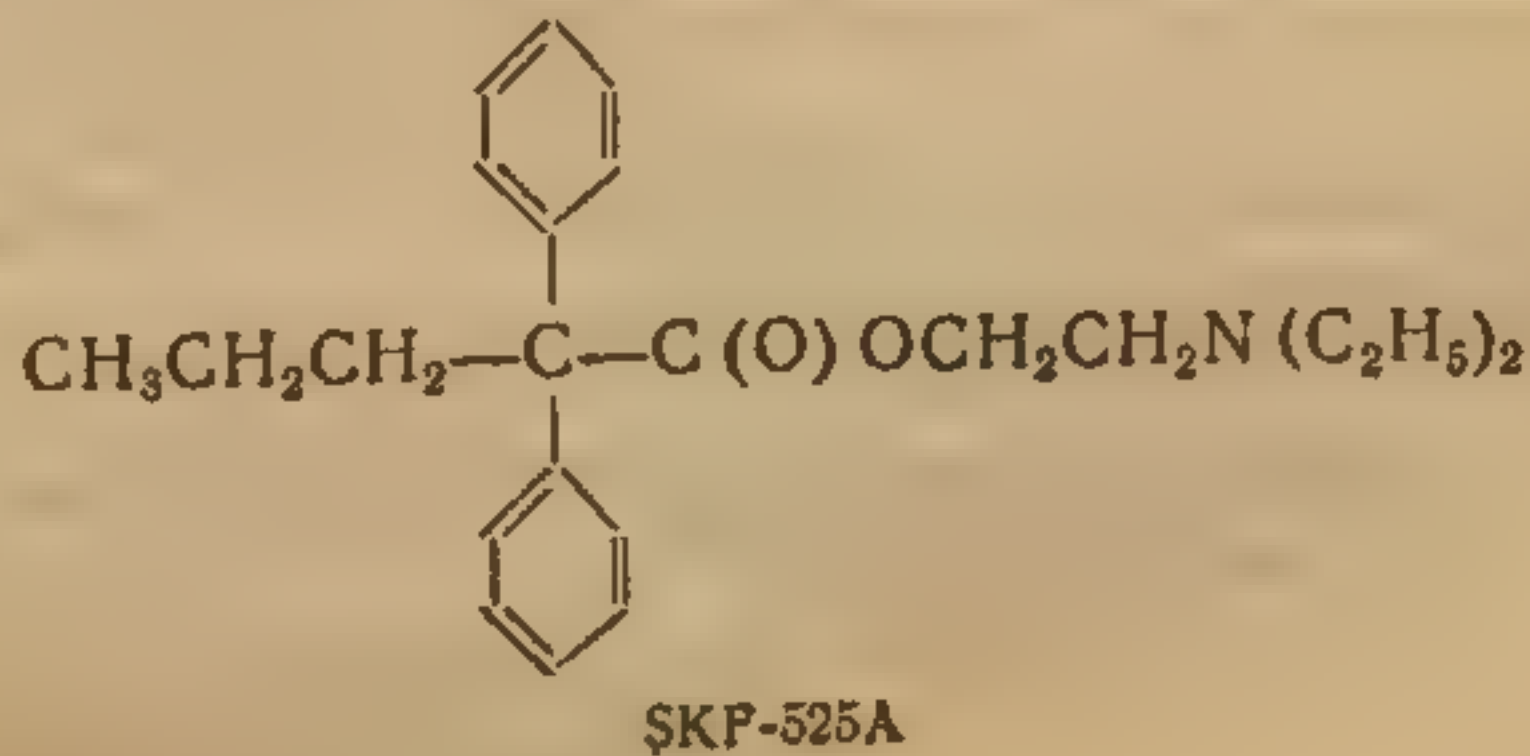


Артур и Касида (Arthur, Casida, 1958) показали, что активация димефокса тоже состоит в его окислении, в результате чего образуется оксиметилпроизводное, аналогичное только что описанному.



Ферментная система, катализирующая окисление шрадана и димефокса, оказалась очень близкой к той, которая вызывает окисление паратиона и других тионатов. Она характеризовалась той же локализацией в клетке, тоже нуждалась в пиридин-нуклеотидах и тормозилась под действием тех же ингибиторов.

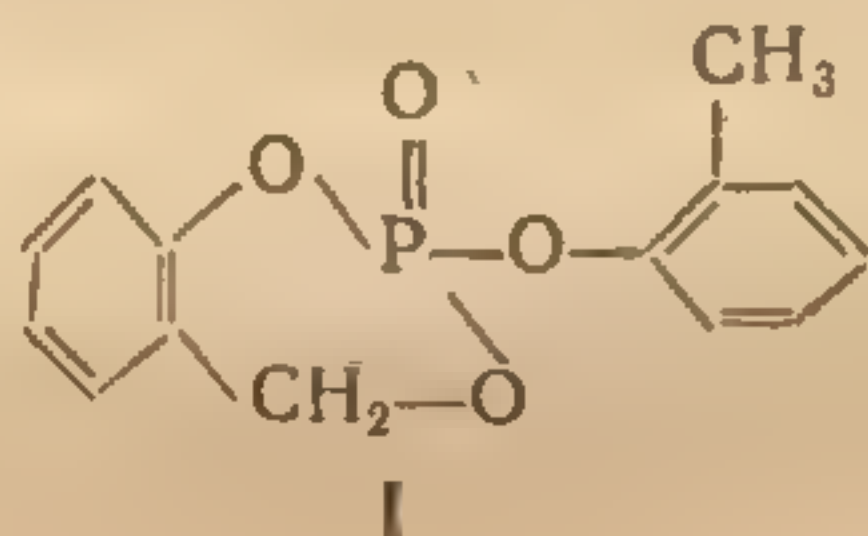
Особый интерес среди веществ, подавляющих окисление шрадана, представляет известный ингибитор моноаминоксидазы SKF-525A.





Благодаря своей способности выраженно тормозить превращение шрадана в токсичный метаболит это соединение может быть использовано в качестве профилактического средства для защиты от отравлений шраданом (O'Brien, Davison, 1958).

Необходимо упомянуть о механизме активации еще одного интересного ФОС, которое часто служит объектом теоретических исследований, особенно при изучении демиелинизации, нередко наблюдаемой при отравлениях ФОС. Речь идет о триортокрезилфосфате (ТОКФ) (см. формулу на стр. 96). Пути его превращения в организме стали известны главным образом благодаря исследованиям Касида и сотрудников, выполненным в последнее время (Casida et al., 1962; Eto, Casida, Eto, 1962). Было установлено, что ТОКФ в организме животных сначала подвергается ферментативному гидроксилированию, а затем спонтанной циклизации, в результате чего образуется соединение (I), которое и является активным метаболитом, определяющим антихолинэстеразные и токсические свойства ТОКФ.



Мы рассмотрели в этом разделе наиболее типичные пути разрушения и активирования ФОС в организме и ограничились лишь некоторыми примерами, иллюстрирующими направления обмена этих соединений. Само собою разумеется, что многие отдельные представители обширного класса ФОС подвергаются своеобразным превращениям, характерным только для данного вещества или для данной группы веществ и зависящим от особенностей их химического строения. Хороший обзор литературных данных об обмене отдельных ФОС в организме млекопитающих, насекомых и растений содержится в монографии О'Брайна (1960).

При рассмотрении ферментативных превращений ФОС возникает совершенно естественный вопрос: откуда в организме животных берутся ферменты, более или менее специфически действующие на вещества, не только совершенно чужеродные для организма, но и отсутствующие в природе в естественных условиях?

Можно попытаться ответить на этот вопрос с позиций гипотезы, недавно выдвинутой Броди (Brodie, 1962). Сопоставив обширные литературные данные о метаболизме лекарственных веществ в организме животных, Броди сделал важное обобщение;



оказалось, что независимо от того, какими путями идет обмен лекарственного вещества (гидролиз, окисление, восстановление, конъюгация и т. д.), продукты реакции всегда оказываются более полярными и менее липидорастворимыми, чем исходные вещества. Необходимость такого превращения диктуется тем, что почки млекопитающих очень плохо приспособлены для выделения липидорастворимых веществ. Клубочковый фильтрат протекает по канальцам, покрытым эпителиальными клетками, которые образуют сплошную мембрану липидного характера. Лекарственные вещества, являющиеся в большинстве случаев очень слабыми органическими электролитами, практически полностью реабсорбируются в канальцах и поэтому почти не выделяются. Для того, чтобы обеспечить их выделение, необходимо сделать их менее растворимыми в липидах. Это и осуществляют ферменты, метаболизирующие лекарственные вещества. По мнению Броди, такие ферменты возникли в процессе эволюции как приспособление, обеспечивающее более быстрое выделение из организма таких примесей к пище, как алкалоиды, терпены, стероиды и др. Благодаря низкой специфичности эти ферменты способны действовать и на лекарственные вещества, не встречающиеся в природе.

В цитированной статье Броди совершенно не касается обмена ФОС, однако рассмотрение с этой точки зрения приведенных выше данных показывает, что они полностью укладываются в гипотезу Броди. Действительно, и гидролиз ФОС, и окисление паратиона и других тионатов в соответствующие кислородные аналоги, и образование оксиметилшрадана, и гидроксилирование ароматических колец ТОКФ — все это приводит к образованию более полярных и менее липидорастворимых веществ, которые должны легче выделяться из организма.

С этих позиций легко понять и то обстоятельство, почему некоторые из обменных превращений ФОС приводят к образованию более токсичных продуктов, т. е. являются чрезвычайно нецелесообразными для организма. Ведь, по выражению Броди, «от фермента нельзя ожидать, чтобы он понимал последствия своего действия».

## ФАРМАКОЛОГИЯ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ

Фармакологические свойства антихолинэстеразных веществ весьма многогранны. Это связано с тем, что холинергические структуры, на которые они оказывают избирательное действие, широко представлены в различных органах и системах.

В целях соблюдения необходимой при обобщении многочисленных экспериментальных материалов стройности, описание фармакологических свойств антихолинэстеразных веществ удобнее всего вести в соответствии с их действием на органы и



системы. Однако, прежде чем перейти к рассмотрению этих данных, необходимо сделать несколько замечаний о значении холинергических структур для функционирования различных органов и систем и определить место антихолинэстеразных веществ среди многочисленных соединений, влияющих на эти структуры (холинергические вещества).

Как известно, все преганглионарные аксоны, часть постганглионарных аксонов (соответствующих преганглионарным аксонам, выходящим из центральной нервной системы в пределах среднего и продолговатого мозга и сакрального отдела спинного мозга) и аксоны двигательных нейронов холинергичны, а постганглионарные аксоны, которые соответствуют преганглионарным аксонам, выходящим из пределов тораколюмбального отдела центральной нервной системы (симпатические волокна), — адренергичны (рис. 15).

Холинергическим и адренергическим структурам соответствуют биохимические системы, определяющие их физиологическую специфичность. Холинорецепторы, расположенные в области окончаний постганглионарных холинергических нервов, относятся к М-холинореактивным системам (мускариночувствительным), а расположенные в области ганглионарных и нервно-мышечных синапсов именуется Н-холинореактивными системами (никотиночувствительными).

Холинергические вещества классифицируются в зависимости от избирательности в действии на М- и Н-холинореактивные системы (М-холиномиметики и холинолитики и Н-холиномиметики и холинолитики). При этом различают М-холинолитики преимущественно центрального и периферического действия. То же относится и к Н-холинолитикам.

Поскольку антихолинэстеразные вещества ингибируют холинэстеразу во всех холинергических структурах, включая как М-, так и Н-холинореактивные системы, они не могут быть отнесены ни к М-, ни к Н-холиномиметикам. Среди обширной группы холинергических веществ они занимают самостоятельное место.

В фармакологических эффектах антихолинэстеразных веществ можно различать М- и Н-холиномиметическое действие. К первому относится действие на секреторные железы, сердце, гладкую мускулатуру бронхов, желудочно-кишечного тракта, глаза, поверхностных артерий и артерий половых желез; ко второму — действие на двигательную мускулатуру и ганглии. Ганглионарные эффекты могут приводить к усилению эффектов как парасимпатических, так и симпатических нервов. Поскольку в физиологическом отношении эти нервы являются реципрокными, действие антихолинэстеразных веществ на ганглии может приводить к различным эффектам в зависимости от того, на какие ганглии действие преобладает.



Исходя из изложенного, нетрудно себе представить, на какие органы и системы и в каком направлении действуют антихолинэстеразные вещества (см. рис. 15). Для избежания возможного при такого рода рассмотрении схематизма в дальнейшем по ходу изложения материалов мы будем приводить конкретные для каждого органа и системы данные, характеризующие холинергические механизмы с учетом прежде всего значения холинэстераз.

## ВЛИЯНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОРГАНЫ И СИСТЕМЫ

### ВЛИЯНИЕ НА ГЛАЗ

Первые наблюдения над действием антихолинэстеразных веществ на зрачок были сделаны Фразером (Fraser, 1862) вскоре после открытия эзерина. Аналогичные данные были описаны в России М. Петржиевичем годом позже. В 1904 г. Андерсон (Anderson) показал, что эзерин перестает сужать зрачок после дегенерации окончаний перерезанного глазодвигательного нерва. В это же время стало известно, что эзерин не действует на зрачок в темноте.

Действие эзерина на глаз состоит в сужении зрачка и снижении внутриглазного давления, чему способствует спазм аккомодации. Сужение зрачка наступает вследствие сокращения круговой мышцы радужной оболочки, имеющей холинергическую иннервацию. При этом расположенные по ее периферии фонтановы пространства и шлеммов канал расширяются, что облегчает отток жидкости из внутренних сред глаза и приводит к снижению внутриглазного давления.

Изолированный *musculus sphincter pupill.* теплокровных животных сокращается при воздействии эзерина в концентрации 1:30 000, большие разведения вызывают дилатацию (Hauschild, 1960). Вследствие сокращения цилиарной мышцы, также имеющей холинергическую иннервацию, наступает спазм аккомодации, так как хрусталик, прикрепленный к указанной мышце, принимает более выпуклую форму (глаз устанавливается на ближайшую точку ясного видения).

Прозерин и другие четвертичные уретаны по силе миотического эффекта уступают эзерину (Aeschlimann, Reinert, 1931).

Антихолинэстеразные вещества вызывают расширение сосудов радужки. Прилив крови и отек цилиарного тела после применения различных антихолинэстеразных веществ наблюдали многие авторы (Scholz, 1946; Mastuda, 1952; Krischna, Leopold, 1960a). Кроме того, в опытах на кроликах показано, что под влиянием антихолинэстеразных веществ повышается проницаемость гистоофтальмического барьера (Gassely, 1953, и др.).



Значительный интерес представляют данные о всасывании и распределении эзерина при введении его в конъюнктивальный мешок. Шумахер (Schumacher, 1956) установил, что после введения в конъюнктивальный мешок 0,05 мл 2%-ного раствора салицилата эзерина последний обнаруживается в водянистой влаге глаза через 10—15 мин. В роговице эзерин обнаруживается в течение 4 ч. Время, в течение которого наблюдается сужение зрачка, соответствует периоду, когда эзерин может быть обнаружен в радужной оболочке и цилиарном теле. В стекловидное тело эзерин проникает в очень небольшом количестве, а в хрусталике не обнаруживается совсем. Однако в ивеа в течение 4 ч определяются значительные количества эзерина. Существует прямая зависимость длительности миоза от времени нахождения эзерина в радужной оболочке.

По силе и продолжительности миотического эффекта антихолинэстеразные вещества заметно отличаются. Некоторое представление об этом дает табл. 18.

Таблица 18

Сравнительная характеристика миотического эффекта некоторых антихолинэстеразных веществ

Препарат	Равноэффективная концентрация %	Продолжительность действия
Эзерин . . . . .	0,5	4 ч
Прозерин . . . . .	5	3—4 »
Амбеноний . . . . .	5	Несколько часов
ДФФ . . . . .	0,1	7 суток
Фосфакол . . . . .	0,25	3 »
Фосфолин . . . . .	0,25	2 »

Первые наблюдения миотического действия ДФФ были сделаны одним из авторов этого препарата — Сондерсом — в 1941 г. По его описанию, он и сотрудники без противогазов входили в камеру, где создавалась концентрация ДФФ 0,008 мг/л, и находились в ней 5 мин. Через 5 мин после выхода людей из камеры у них развивался сильный миоз, который длился до 7 дней, хотя постепенное ослабление симптомов отмечалось через 3 суток. В дальнейшем автор заметил, что у него миоз возникал при работе со значительно меньшими концентрациями ДФФ или близкими ему соединениями. Миоз сопровождался головными болями и болями в глазах с местом локализации «позади глаза», особенно выраженными при изменении освещения от яркого к слабому. При этом зрачковые рефлексy отсутствовали, а острота зрения была снижена.

ДФФ в концентрации 50 мг/м<sup>3</sup> при пятиминутной экспозиции вызывал гиперемию сосудов, продолжавшуюся не более суток.

Сравнительная характеристика миотического эффекта некоторых антихолинэстеразных веществ

Рис. 15. Схема вегетативной нервной системы человека

— симпатическая нервная система

— парасимпатическая нервная система



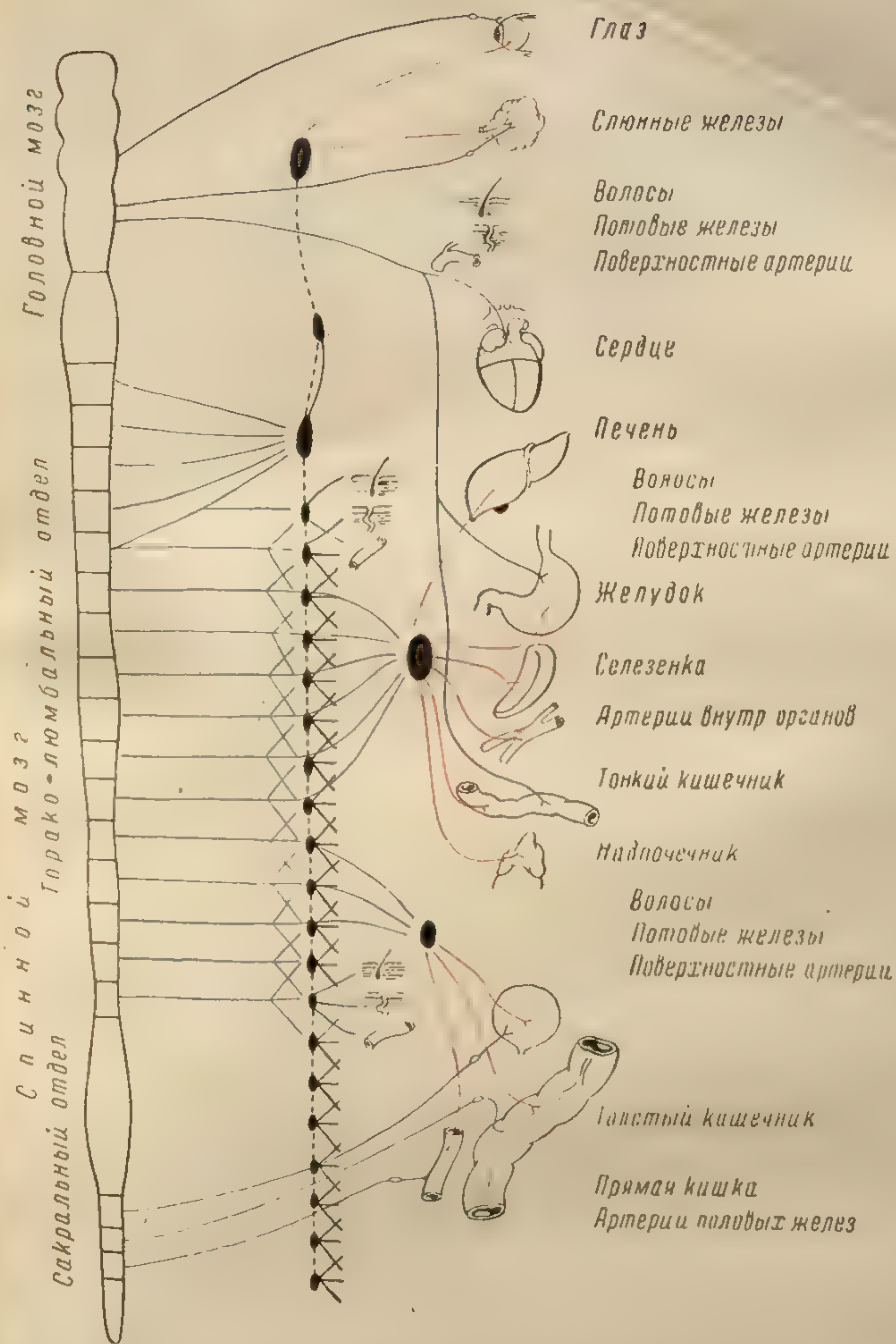


Рис. 15. Схема вегетативной иннервации (В. В. Закусова, 1960).

Синие линии — холинергические нервы; красные — адренергические; пунктирные линии — преганглионарные нервы; сплошные — постганглионарные.



Повторные дозы атропина расширяли зрачок и уменьшали застойные явления в глазу.

Заслуживает внимания заявление автора о том, что даже через 15 лет после того, как он впервые испытал на себе действие ДФФ, у него сохранились искажения в восприятии белого цвета (при миозе белые поверхности кажутся желтыми).

Опхолт и др. (Upholt et al., 1956), исследуя влияние ТЭПФ на зрение, обратили внимание на то, что вызываемый этим веществом спазм аккомодации приводит не только к нарушению ближнего зрения (макропсия), но и несколько снижает восприятие предметов, находящихся вдали, однако не в такой степени, чтобы нельзя было судить о расстоянии. В случае возникновения одностороннего миоза эта способность нарушается, о чем свидетельствуют указания пилотов, распылявших инсектициды с самолетов. Очень сильно страдает зрение в темноте (Сондерс, 1961).

Подробные данные о действии ДФФ на глаз представили Леопольд и Комрое (Leopold, Comroe, 1946), однако они чего-нибудь принципиально нового в наблюдениях Сондерса не внесли. Наибольший интерес представляют сравнительные данные авторов о действии различных антихолинэстеразных веществ на внутриглазное давление. Оказалось, что ДФФ вызывает более сильное и продолжительное снижение внутриглазного давления, чем 1%-ный раствор эзерина и 5%-ный раствор прозерина. В последнее время ведутся довольно интенсивные исследования в области изыскания эффективных средств, предназначенных для снижения внутриглазного давления. Целый ряд фосфорорганических соединений (фосфакол, армин, ибуфин и др.) прошли клинические испытания, причем некоторые из них вошли в офтальмологическую практику (см. стр. 260—263).

Проведенный анализ механизма физиологического действия ДФФ подтвердил старые данные Андерсона, который показал, что эзерин не обладает свойственным пилокарпину прямым действием на радужку глаза. Известно также, что в случае предварительного угнетения холинэстеразы прозерин ДФФ миоза не вызывает.

Таким образом, действие ДФФ и других антихолинэстеразных веществ на глаз целиком зависит от угнетения холинэстеразы в синапсах глазных мышц, а возможно, и сетчатки, внутренний синаптический слой которой, согласно данным Френсиса (Francis, 1953), содержит ацетилхолинэстеразу, которая легко ингибируется ДФФ.

Несмотря на то, что все эффекты антихолинэстеразных веществ на глаз находят объяснение в их периферическом действии, есть основания полагать, что в нарушениях зрения, вызываемых этими веществами, могут участвовать и центральные механизмы. В этом отношении небезынтересны данные Рубина



и Гольдберга (Rubin, Goldberg, 1957, 1958) о влиянии зарина на темновую адаптацию у человека. Авторы установили, что вдыхание в течение 2 мин воздуха, содержащего 2,03—2,73 мг/м<sup>3</sup> зарина, вызывает у взрослого человека небольшой миоз и значительное повышение абсолютного зрительного порога в адаптированном к темноте глазу. Эти явления не исчезали полностью даже по истечении суток. Инстилляцией водного раствора зарина в конъюнктивальный мешок не привела к повышению абсолютного зрительного порога, хотя и сопровождалась более сильным миозом. Нарушения темновой адаптации имели место и в том случае, если глаза защищались от непосредственного контакта с парами зарина (авторы использовали искусственный зрачок). Если же один глаз оставался незащищенным, нарушения все равно были двусторонними. Внутримышечная инъекция атропина в дозе 2 мг значительно ослабляла влияние зарина на темновую адаптацию, однако введение четвертичного аналога атропина, плохо проникающего через гемато-энцефалический барьер, оказалось неэффективным. При исследовании влияния зарина на темновую адаптацию глаз авторы не уловили его положительного влияния, которое можно ожидать на основании данных М. С. Трусова (1959) о повышении световой чувствительности и ускорении процесса темновой адаптации у человека под влиянием небольших доз эзерина. Максимальное повышение этих показателей наблюдалось через 2—3 ч после инъекции 0,5—0,8 мл 0,1%-ного раствора эзерина и держалось до 6—8 ч.

Из сказанного видно, что миотический эффект вызывают как обратимые, так и необратимые ингибиторы холинэстеразы. Особенность последних состоит в том, что они вызывают более продолжительный эффект (см. табл. 18). Это навело на мысль исследовать миотическое действие тех и других в комбинации. Такие исследования были проведены Леопольдом и Кришна (Leopold, Krischna, 1961), которые в качестве необратимого ингибитора холинэстеразы использовали экотиофат (фосфолин), а в качестве обратимого — амбеноний. Экотиофат вызывал у кошек миоз при закапывании 0,25%-ного раствора, действие наступало через 15 мин и длилось двое суток. Амбеноний (5%-ный раствор) аналогичный эффект вызывал быстрее, но его длительность была небольшой. Оказалось, что эффект комбинации экотиофата и амбенония был слабее, чем каждого препарата в отдельности. Ослабление эффекта также происходило в случае, если экотиофат применялся после амбенония. Если же препараты вводились в обратном порядке, то действие несколько усиливалось. Объяснение этих данных, по-видимому, следует искать в характере угнетения холинэстеразы обратимыми и необратимыми ингибиторами. Обратимое угнетение холинэстеразы



амбенонием «защищает» фермент от необратимого угнетения эфотифатом (поскольку действие последнего развивается медленнее, то эффект амбенония успевает проявиться и в случае их одновременного применения). При обратном порядке введения, когда вначале действует необратимый ингибитор, эти отношения, естественно, нарушаются.

Между антихолинэстеразными веществами и атропином в действии на глаз существует двусторонний антагонизм (Stone, 1950). Миоз, вызванный необратимыми ингибиторами холинэстеразы, значительно труднее устраняется атропином по сравнению с миозом, вызванным эзеринем, прозеринем и амбенонием. В последнее время появились данные о том, что миоз, вызванный различными антихолинэстеразными веществами, может быть устранен реактиваторами холинэстеразы (Мамо, Leopold, 1958; Krishna; Leopold, 1961). Авторы вызывали у кроликов максимальный миоз закапыванием растворов эзерина (0,5%), прозерина (5%), ДФФ (0,1%) и фосфакола (0,25%). Затем субконъюнктивально вводили 0,2 мл 5%-ного раствора ПАМ. Максимальное расширение зрачка наступило через 3 ч и продолжалось 6 ч. Использование этих данных на практике вряд ли возможно, так как антагонистическое действие ПАМ по отношению к антихолинэстеразным веществам наступает медленно и воспроизводится только при субконъюнктивальной инъекции. Антагонистические эффекты реактиваторов холинэстеразы были воспроизведены также в опытах на глаукоматозных глазах (Bucker et al., 1959). Оказалось, что оксими устраняют такие эффекты антихолинэстеразных веществ, как миоз, снижение внутриглазного давления и усиление оттока внутриглазной жидкости.

### ВЛИЯНИЕ НА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ

Влияние антихолинэстеразных веществ на желудочно-кишечный тракт выражается в усилении эффектов блуждающего нерва, которое проявляется стимуляцией секреции пищеварительных желез и возрастанием двигательной активности желудка и кишечника (увеличение частоты и амплитуды сокращений тонкого и толстого кишечника, усиление моторики желудка).

### Влияние на пищеварительные железы

Как известно, гуморальным передатчиком для секреторных желез является ацетилхолин (Beznák, 1932). В слюнных железах содержится холинэстераза, причем больше истинная, чем ложная (MacIntosh, 1937; Riker, Wescoe, 1949; Dirnhuber, Evans, 1954).



Гейденгайн (Heidenhain) еще в 1872 г. показал, что эзерин усиливает секрецию слюнных желез. Это действие проявлялось и в случае паралича ганглионарной передачи никотином, но устранялось атропином.

При введении антихолинэстеразных веществ в больших дозах, напротив, наблюдается снижение секреции (Evans, 1951).

Дирнубер и Эванс (Dirnhuber, Evans, 1954) нашли, что введение антихолинэстеразных веществ в артерию, питающую подчелюстную железу (опыты ставились на собаках и кошках), резко усиливает секрецию в ответ на раздражение *chordae tympani* или введение ацетилхолина.

Эммелин, Мурер (Emmelin, Murer, 1950) и Дирнубер и Эванс (1954) наблюдали усиление секреции слюны при перфузии железы эзеринизированной кровью или плазмой. Антихолинэстеразные вещества усиливают секрецию слюны не только в ответ на стимуляцию холинергических, но и адренергических нервов (Dirnhuber, Evans, 1954).

Эзерин оказывает также влияние на так называемую пароксизмальную секрецию. Этот феномен характеризуется перемежающейся секрецией слюны денервированной железой. «Пароксизмальная» секреция, по-видимому, возникает вследствие хаотичного освобождения ацетилхолина на дегенерируемых постганглионарных нервных окончаниях. Введение в слюнный проток эзерина провоцирует появление «пароксизмальной» секреции и удлиняет ее период (Emmelin, Strömblad, 1958).

Коллумбайн и Дирнубер (Cullumbine, Dirnhuber, 1955) установили, что степень секреции возрастает параллельно с тяжестью отравления антихолинэстеразными веществами. Путем экстраполирования экспериментальных данных авторы нашли, что при тяжелом отравлении человека заринном общий объем секрета достигает 1,75 л.

Действие эзерина, прозерина и других «обратимых» ингибиторов холинэстеразы на секрецию слюнных желез сравнительно непродолжительно (до 3—4 ч), в то время как «необратимые» фосфорорганические ингибиторы холинэстеразы вызывают длительное усиление слюноотделения. Согласно данным Т. Ю. Ильюченко (1957), при подкожном введении небольшой дозы фосфакола и других ФОС на длительное время усиливается секреция околоушных и подчелюстных желез собак, при этом в течение 20 дней наблюдается повышенная чувствительность желез к пилокарпину.

Секреторное действие ДФФ и других ФОС уступает пилокарпину, однако превосходит ацетилхолин, который на секрецию влияет довольно слабо (Cullumbine, Dirnhuber, 1955).

Согласно данным Дирнубера и др., ДФФ вызывает спонтанную секрецию слюны при угнетении истинной холинэстеразы подчелюстной железы собаки на 60%. Угнетение ложной



холинэстеразы на 80% не вызывает спонтанной секреции, но усиливает эффект ацетилхолина. Следовательно, холиносенсибилизирующее действие ДФФ на слюнную железу связано преимущественно с угнетением ложной холинэстеразы, в то время как изменения спонтанной секреции зависят от уровня истинной холинэстеразы. Аналогичные данные были получены и с «обратимыми» ингибиторами холинэстеразы: N-хлорфенил N-метилкарбаматом, м-оксифенилтриметиламмоний бромидом и 1,5-бис(-4-аллилдиметиламмоний-фенил)-н-пентан-3-он бромидом.

Между уровнем угнетения активности ацетилхолинэстеразы слюнной железы и величиной секреторного эффекта ДФФ существует поддающаяся количественной оценке зависимость (Riker, Wescoe, 1949).

Саливация, вызванная антихолинэстеразными веществами, относится к периферическим эффектам, так как она не прекращается после перерезки секреторного нерва или фармакологической блокады передачи на ганглионарном уровне. В пользу преимущественно периферического характера секреторного действия антихолинэстеразных веществ убедительно говорят и вышеприведенные данные о существовании зависимости между этим эффектом и угнетением холинэстеразы. После хронической преганглионарной денервации желез наблюдается феномен повышенной чувствительности к антихолинэстеразным веществам (Emmelin, Strömblad, 1957), в то время как при острой и после хронической постганглионарной денервации этого явления не отмечено (Dirnhuber, Evans, 1954; Emmelin et al., 1954; Emmelin, Strömblad, 1958a). Механизм повышения чувствительности желез после хронической преганглионарной денервации не выяснен.

Согласно данным Штромбледа (Strömblad, 1955, 1957), активность холинэстеразы в случае преганглионарной и постганглионарной денервации снижается соответственно на 30 и 60%. Однако строгой зависимости между степенью повышения чувствительности железы к антихолинэстеразным веществам и уровнем снижения активности холинэстеразы отметить не удалось.

Антихолинэстеразные вещества усиливают секрецию желудочного сока, в котором возрастает содержание как соляной кислоты, так и пепсина (Pewsner, 1906), и повышают кишечную секрецию (Uvnäs, 1948), а также секрецию поджелудочной железы (Gottlieb, 1894).

Эзерин стимулирует секрецию амилазы поджелудочной железой голубя и усиливает процесс включения меченого фосфора в фосфолипидную фракцию (Hokin L. E., Hokin M. R., 1953). Согласно данным Яквеса (Jaques, 1954), ТЭПФ, ГЭПФ и паратион как при энтеральном, так и при парентеральном повторных введениях в токсических дозах вызывают у крыс и морских



свинок гиперсекрецию желудочных желез с повышенной переваривающей активностью желудочного сока. Это действие было сильнее выражено у наркотизированных животных. Перерезка блуждающего нерва и атропинизация угнетали секреторное действие антихолинэстеразных веществ. Продолжительное усиление секреции, сопровождающееся повышенной переваривающей активностью желудочного сока, приводило к возникновению многочисленных и глубоких язв желудка. При этом наблюдалось соответствие между количеством и размерами эрозий и язв, с одной стороны, и интенсивностью и длительностью гиперсекреции — с другой.

Френч, Портер и др. (French, Porter et al., 1954) путем раздражения гипоталамуса вызывали резкое стабильное усиление секреции соляной кислоты желудком. Было установлено двоякое влияние: передняя гипоталамическая область, действуя через блуждающий нерв, вызывала раннюю секрецию HCl, достигающую максимума в течение часа; задняя гипоталамическая область, действуя через гипофиз и кору надпочечников, вызывала позднюю секрецию HCl, достигающую максимума через три часа после раздражения.

ФОС оказывают выраженное влияние и на кишечную секрецию. В опытах Т. Ю. Ильюченко (1957) пирофос уже в субтоксических дозах (0,1 смертельной дозы) вызывал при однократном подкожном введении собакам увеличение кишечной секреции. Интересно, что в день введения пирофоса кишечная секреция не изменялась, но уже через 72 ч увеличивалась на 247%. В течение 17 суток количество отделяемого секрета оставалось повышенным (на 195—204%), а затем возвратилось к исходному уровню. При постановке опытов по методу Савича с орошением слизистой оболочки кишки взвесью каломеля отмечалось максимальное увеличение секреции через 144 ч после однократного введения пирофоса в той же дозе. Секреция достигала исходных цифр через 15 дней. Действие на секрецию у различных ФОС выражено неодинаково. Строгой зависимости между токсичностью ФОС и их влиянием на секрецию отметить не удастся.

#### Влияние на двигательную функцию желудочно-кишечного тракта

О сильном влиянии антихолинэстеразных веществ на двигательную функцию желудочно-кишечного тракта свидетельствует ряд симптомов, постоянно встречающихся при отравлении эзерином, прозерином и фосфорорганическими антихолинэстеразными веществами (усиление перистальтики, кишечные спазмы, сопровождающиеся сильными болями в животе, поносы).



Харнак и Витковский (Harnak, Witkowski, 1876) впервые указали на то, что эзерин вызывает усиление перистальтики желудка и кишечника.

В дальнейшем эти наблюдения нашли экспериментальное подтверждение в опытах на изолированном желудке (Schütz, 1886), кишечнике (Subbotin, 1869; Jacobi, 1891) и изолированном отрезке кишки (Unger, 1907).

Наибольшей чувствительностью к антихолинэстеразным веществам обладает, по-видимому, двенадцатиперстная кишка. Кроп и Кункель (Krop, Kunkel, 1954) показали, что некоторые фосфорорганические соединения (зарин, табун) вызывают усиление тонуса и ритма сокращений двенадцатиперстной кишки в таких дозах, которые еще не влияют на дыхание и кровообращение. С увеличением дозы эффект этих соединений становился более выраженным. Так, Холмстедт (Holmstedt, 1951) установил, что табун вызывает в течение 1—2 мин сильный спазм кишки, если он вводится в дозах, нарушающих функции дыхания и кровообращения.

Физиологический анализ показал, что антихолинэстеразные вещества вызывают усиление всех трех видов двигательной активности: маятникообразных сокращений, тонуса и перистальтики. При воздействии большими дозами антихолинэстеразных веществ стимулирующее влияние на движения кишечника сменяется параличом.

Аналогичное действие на мускулатуру кишечника кролика оказывает «обратимый» ингибитор холинэстеразы — нивалин. Д. М. Пасков (1958) установил, что нивалин как на изолированном отрезке кишечника (в концентрациях  $10^{-7}$  и выше), так и на кишечнике *in situ* в дозах 0,1 мг/кг и выше вызывает спазмы гладкой мускулатуры. Эти спазмы снимаются атропином. Как и другие антихолинэстеразные вещества, нивалин потенцирует действие ацетилхолина и эффект раздражения блуждающего нерва на кишечник. Аналогичные данные были получены и в отношении мускулатуры мочевого пузыря кошки.

По данным И. И. Лещинюка (1963), антихолинэстеразные препараты, аминопроизводные пиразола (пиротенз, препарат ИЭМ-250 и тензамин) в концентрациях  $4 \cdot 10^{-8}$  и  $4 \cdot 10^{-9}$  вызывают резкое повышение тонуса и амплитуды сокращений изолированных отрезков кишечника кролика и кошки.

Антихолинэстеразные вещества усиливают сокращения ресничек пищевода лягушки и трахеи кролика (Kordik et al., 1952), а также реснитчатого эпителия эксплантата трахеи человека (Gunter, Allen, 1959).

Влияние антихолинэстеразных веществ на двигательную функцию кишечника осуществляется благодаря угнетению холинэстеразы в синаптических образованиях кишечника. Наиболее убедительно это было показано в опытах Шелли (Shelly,



1955). Автору удалось установить количественную зависимость между степенью повышения тонуса продольной мышцы двенадцатиперстной кишки кролика и уровнем угнетения активности холинэстеразы (рис. 16).

Показано также, что восстановление активности холинэстеразы кишки при помощи 2ПАМ снимает возбуждающее дей-

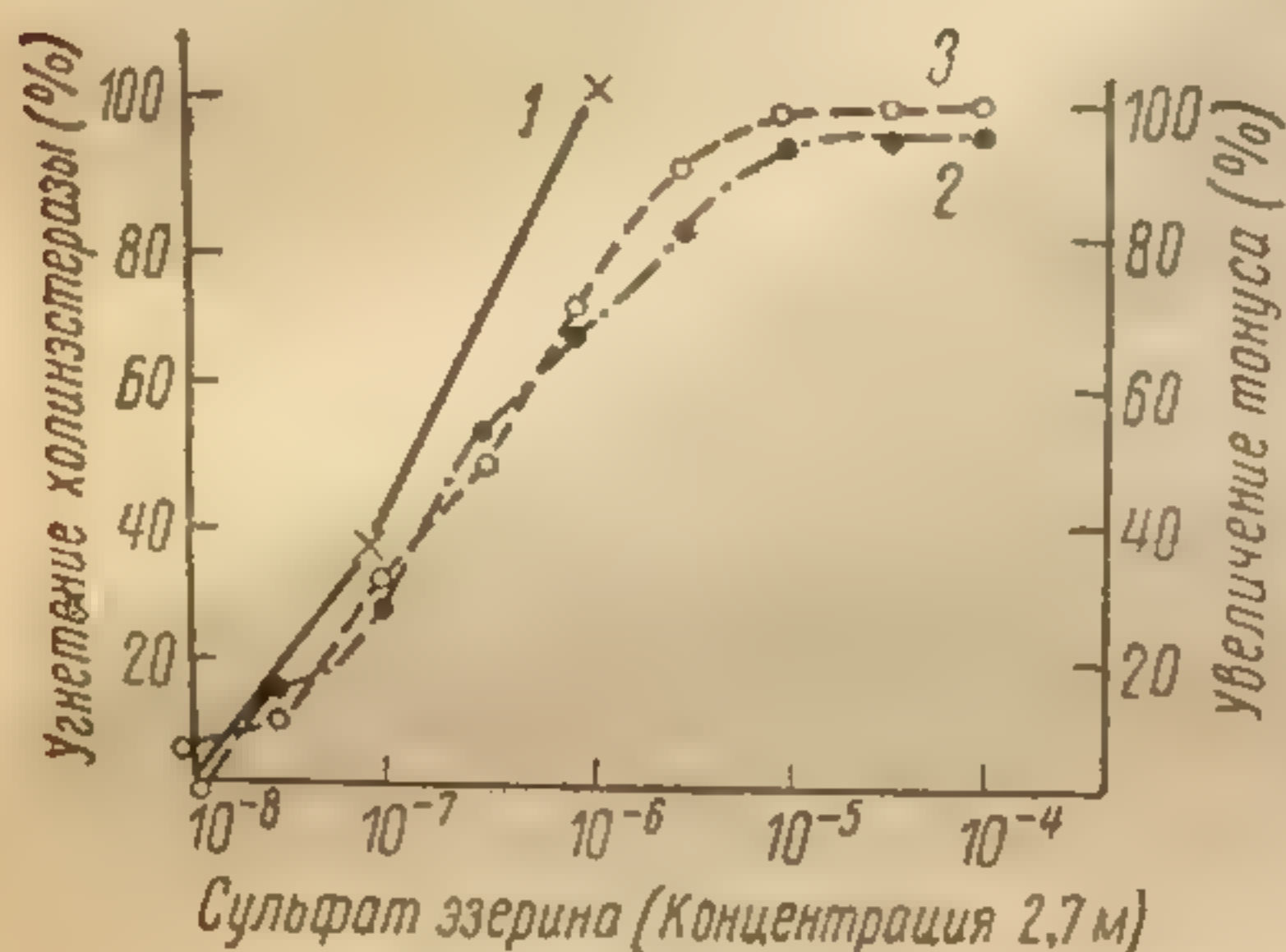


Рис. 16. Зависимость между увеличением тонуса изолированной продольной мышцы двенадцатиперстной кишки кролика и уровнем угнетения холинэстеразы (Shally, 1955).

1 — мышечный тонус; 2 — псевдохолинэстераза; 3 — истинная холинэстераза.

Так, И. В. Заиконникова и И. А. Студенцова (1962) показали, что нибуфин (п-нитрофениловый эфир дибутилфосфиновой кислоты) вызывает усиление сокращений кишечника и после выключения нейро-гуморальной передачи в кишке охлаждением.

При сопоставлении эффектов обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы следует отметить значительно большую продолжительность действия последних. В опытах на изолированном отрезке кишечника кролика было показано, что действие обратимых ингибиторов легко устраняется отмыванием, в то время как эффект необратимых ингибиторов держится и после отмывания. Обратимость эффектов не связана со степенью угнетения холинэстеразы, а исключительно зависит от характера связи ингибитора с ферментом (табл. 20).

действие фосфакола, тиофоса и систокса на тонус и автоматические сокращения отрезка кишки кролика (Erdmann, Neue, 1958).

В табл. 19 представлены данные, характеризующие зависимость между степенью угнетения активности холинэстеразы кишки и эффектом антихолинэстеразных веществ.

Вряд ли, однако, можно безоговорочно принять антихолинэстеразный механизм для объяснения любых эффектов алкилфосфатов и других соединений на кишечник.

Таблица 19

Связь между угнетением холинэстеразы кишки и эффектом (Admiral et al., 1955)

Степень угнетения холинэстеразы (в %)	Эффект
25	Возбуждение продольных мышц
40	Возбуждение циркулярных мышц
80	Усиление перистальтики



Сравнительная характеристика эффектов обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы (опыты на изолированном отрезке кишки кролика). — Salerno, Coop, 1949

Соединения (в порядке убывания активности)	Минимальная молярная концентрация, вызывающая изменение ритма	Концентрация, вызывающая равноначное угнетение холинэстеразы	Сохранение эффекта после отмывания
ТЭПФ . . . . .	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$	+
Эзерин . . . . .	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	—
Прозерин . . . . .	$4,3 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	—
ГЭТФ . . . . .	$9,8 \cdot 10^{-8}$	$5,0 \cdot 10^{-8}$	+
ДФФ . . . . .	$5,43 \cdot 10^{-7}$	$10,0 \cdot 10^{-8}$	+

Одним из косвенных доказательств антихолинэстеразного механизма возбуждающего действия на моторику кишечника эзерина и близких к нему веществ, являются данные о возможности устранения этого действия веществами, ингибирующими ацетилирование холина. Как было показано Джойо и Морпурго (Gioia, Morpurgo, 1958), натриевые соли дифенилилбутилуксусной кислоты, вызывающие уменьшение образования ацетилхолина в кишке, способны значительно уменьшить двигательную активность изолированной кишки морской свинки, вызванную эзеринем, прозеринем и особенно пиридостигмином; при этом реакция на ацетилхолин сохранялась, что свидетельствовало об отсутствии у применяемых солей уксусной кислоты атропиноподобных свойств.

Таким образом, возбуждающее действие антихолинэстеразных веществ на моторику кишечника снимается следующими веществами:

1. Атропиноподобными (блокирующими М-холинорецепторы в конечном мионевральном синапсе).
2. Ганглиоблокирующими (блокирующими Н-холинорецепторы в синапсах ганглиев).
3. Реактиваторами холинэстеразы.
4. Ингибиторами синтеза ацетилхолина.

В больших дозах антихолинэстеразные соединения вызывают паралич кишечника (Heathcote, 1932; Shally, 1955). Этот эффект не устраняется ни атропином, ни реактиваторами холинэстеразы. Этим отрицается его холинергическая природа и подразумевается другой механизм, вероятнее всего прямое мускулотропное действие (Erdmann, Neue, 1958). Понятно, что такое объяснение годится только для части антихолинэстераз — в частности, фосфакола, тиофоса и систокса, поскольку могут быть соединения, вовсе не обладающие мускулотропным действием. Допуская возможность мускулотропного парализующего действия антихолинэстераз, нельзя, однако, исключить и другой



возможности толкования этого эффекта. Ведь в данном случае речь идет о применении чрезмерных дозировок препаратов, вызывающих полное угнетение холинэстеразы и накопление больших количеств ацетилхолина, которые могут вызывать пессимальную реакцию мышцы, т. е. паралич.

Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева обнаружили, что при повторном действии на изолированный отрезок тонкой кишки фосфакол приводит к сокращению кишки, несмотря на полную инактивацию холинэстеразы, вызванную его предшествующим воздействием. Эти же авторы показали, что фосфакол оказывает свое действие не только на холинорецепторы кишки, но и возбуждает ганглионарный аппарат. Аналогичным является механизм угнетающего эффекта фосфакола на предсердие кошки.

Фредрикссон и Тейблинж (Fredriksson, Tibbling, 1959) изучали действие на изолированную двенадцатиперстную кишку кролика метилфосфорилхолина, метилфосфорил- $\beta$ -метилхолина, метилфторфосфорилгомохолина и метилфторфосфорилкарбохолина. Все вещества, являющиеся фосфорорганическими аналогами ацетилхолина, мехолина, гохолина и карбохолина, вызывали сокращение кишки кролика, холинэстераза которой предварительно была полностью инактивирована в результате тридцатиминутной обработки заринном в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Эти сокращения были невелики, так как происходили на фоне контрактуры, вызванной заринном, но вполне достоверны и зависели от возбуждающего влияния препаратов на холинорецепторы кишки.

Роль угнетения ложной холинэстеразы кишечника в механизме действия ингибиторов остается неясной. Некоторые исследователи, исходя из обнаружения ложной холинэстеразы в ганглионарных клетках ауэрбахового сплетения и полагая, что этот фермент необходим для моторики кишечника, склонны считать, что влияние ДФФ и других соединений, ингибирующих преимущественно бутирилхолинэстеразу, на подвижность кишки зависит именно от этого эффекта (Koelle et al., 1950). Однако прямых доказательств этого предположения еще не получено.

При оценке действия антихолинэстеразных веществ на желудочно-кишечный тракт необходимо учитывать и интероцептивные влияния, передающиеся по афферентным нервам в центральную нервную систему в связи с возникшими в кишечнике функциональными изменениями. В этом отношении заслуживают внимания данные Д. С. Паскова (1958), который провел электрофизиологический анализ влияния нивалина на афферентную импульсацию в нервах кишечника. Он исследовал изменения обоих типов потенциалов афферентных импульсов кишечника: быстрых высокоамплитудных и медленных низкоам-



плитудных. Нивалин в малых дозах (0,5—1 мг/кг) вызывал учащение быстрых и появление медленных потенциалов. Учащение быстрых межгрупповых потенциалов наблюдалось в интервалах между групповыми вспышками. Автор полагает, что изменение потенциалов импульсов чревного нерва происходит от вызываемых нивалином спазмов кишечника.

Здесь же уместно привести данные В. Н. Черниговского (1943), который наблюдал после введения эзерина в сосуды изолированной кишечной петли рефлекторное возбуждение сосудодвигательного и дыхательного центров.

Из приведенных выше материалов видно, что различные антихолинэстеразные вещества, независимо от их принадлежности к той или иной группе, оказывают совершенно определенное действие на двигательную функцию кишечника, в связи с чем они нашли соответствующее клиническое применение (лечение послеоперационной атонии кишечника см. стр. 257). Что касается влияния тех же веществ на двигательную функцию желудка, то этот вопрос до сего времени остается почти не изученным. Поскольку желудок так же, как и кишечник, имеет холинэргическую иннервацию, допустимо считать, что антихолинэстеразные вещества могут усиливать моторику желудка. Это тем более вероятно, что при отравлении (особенно, пероральном) эзерином и другими антихолинэстеразными веществами часто наблюдается рвота, одной из причин которой может быть усиление двигательной функции желудка. Прямые указания на этот счет можно найти у Тогни (Togni, 1954), который установил, что в рубце коровы имеется фермент, соответствующий холинэстеразе, активность которого угнетается эзерином и ДФФ.

Согласно данным А. А. Алиева (1958), прозерин в дозе 0,1 мг/кг, введенный подкожно, повышал тонус мускулатуры рубца и несколько тормозил двигательную активность кишечника. В дозе 0,5—0,6 мг/кг прозерин сильнее повышал тонус мускулатуры рубца и усиливал сокращения толстого кишечника. При этом время прохождения содержимого по пищеварительному каналу сокращалось на 2—4 ч.

Брунанд и Наварро (Brunand, Navarro, 1953, 1955) исследовали действие прозерина, ДФФ и препарата 309С (диметилкарбамат-м-оксифенилдиэтилметиламмоний метилсульфат) на двигательную функцию разных отделов желудка барана. Оказалось, что все три препарата в малых дозах оказывают стимулирующее влияние на моторику желудка. Авторы установили, что наряду с периферическим эффектом антихолинэстеразных веществ в данном случае также проявлялось действие на нервные центры. Авторы не склонны приписывать значительную роль периферическому антихолинэстеразному действию, так как тонизирование блуждающего нерва на фоне эзерина не приво-



дило к остаточному эффекту, неизбежному при накоплении негидролизующегося ацетилхолина.

Такого же мнения придерживается Дуссардье (Dussardier, 1954).

### ВЛИЯНИЕ НА НЕКОТОРЫЕ ЖЕЛЕЗЫ

Стимулирующее секрцию действие антихолинэстеразных веществ не ограничивается пищеварительными и бронхиальными железами — оно распространяется и на другие железы (потовые, слезные и др.).

Как известно, потовые железы иннервируются волокнами, относящимися к симпатической нервной системе. Эти волокна являются отростками клеток, лежащих в симпатических ганглиях. Особенностью этих отростков (постганглионарных пототделительных симпатических нервных волокон) является то, что они холинергичны. Центральные эфферентные механизмы пототделения расположены вдоль всего спинного мозга соответственно расположению нейронов, из аксонов которых слагаются симпатические волокна. До недавнего времени единственным доказательством холинергической постганглионарной иннервации потовых желез являлся хорошо известный факт резкого усиления секрции потовых желез под влиянием ацетилхолина и его миметиков и подавления секрции атропином. Обнаружение в потовых железах холинэстераз — как истинной, так и ложной (Hollman, 1951, 1952; Hurley et al., 1953; Magnus, Thompson, 1954) — явилось важным аргументом в пользу того, что передача с постганглионарных симпатических волокон на потовые железы действительно осуществляется при помощи ацетилхолина.

Действие эзерина на потовые железы известно давно. Вначале это были наблюдения за действием эзерина у людей (Wilson, 1934). Экспериментальные исследования, проведенные Гасье и Мейером в 1937 г. (Gasnier, Mayer), показали, что эзерин резко усиливает потогонное действие ацетилхолина. Эти данные были воспроизведены и другими авторами (Manula, 1952; Brun, Fawe, 1954, и др.). Сам эзерин (прозерин) также вызывает усиление секрции пота (Janowitz, Grossman, 1950), но значительно более слабое, чем ацетилхолин, пилокарпин и никотин. Присутствие холинэстеразы в потовых железах, а также данные о том, что в условиях постганглионарной денервации потовых желез эзерин в обычных дозах не эффективен — факты, свидетельствующие об антихолинэстеразном механизме секреторного действия эзерина. Интерес к вопросам, связанным с секреторным влиянием антихолинэстеразных веществ, возрос после того, как было установлено, что фосфорорганические соединения оказывают по сравнению с эзерином значительно больший потогонный эффект. При исследовании резорбтивного



действия малых доз зарина на человека Гроб (Grob, 1956) у 4 человек из 10 наблюдал повышенную потливость. Инъекция 0,003—0,005 мг/кг зарина в плечевую артерию вызывала профузное потоотделение в этой конечности, несмотря на то, что перед этим внутримышечно было введено 2,25 мг атропина. Усиленная секреция потовых желез продолжалась 12 ч. Этот пример говорит о том, что влияние фосфорорганических веществ на секрецию пота является ранним признаком отравления и может считаться одним из чувствительных показателей их токсического действия.

Количественное изучение изменения секреции потовых желез представляет значительные трудности ввиду невозможности канюлирования протоков этих желез с целью собирания секрета. Положение несколько улучшилось после того, как Рандаль (Randall, 1946) предложил остроумный способ исследовать потоотделение при помощи наложения на кожу бумаги, пропитанной йодом и крахмалом. Количество мелких окрашенных пятен на бумаге, выявленных после соответствующей обработки, свидетельствует об интенсивности потоотделения. (Описание этого и других методов см. в обзоре Рандаля и Кимуры — Randall, Kimura, 1955.)

Наряду с потоотделением антихолинэстеразные вещества вызывают усиление секреции слезных желез, однако этот симптом менее постоянен (Scholz, 1946). Наиболее отчетливо он проявляется у крыс. Впрочем, возможно, это связано с его демонстративностью (слезы у крыс окрашены в красный цвет — хромодакриорея).

#### ВЛИЯНИЕ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МАТКИ

В связи с тем, что постганглионарные симпатические нервные волокна, иннервирующие гладкие мышцы матки, холинергичны (во всяком случае у человека), можно ожидать стимулирующего влияния антихолинэстеразных веществ на сократительную деятельность матки. Этот вопрос заинтересовал исследователей в связи с возможностью использования антихолинэстеразных веществ в практике родовспоможения (М. Я. Михельсон, 1951, 1952). Экспериментальное изучение влияния прозерина на сократительную деятельность матки провела З. А. Дроздова (1951, 1957а). Опыты ставились на морских свинках, у которых *in situ* записывались сокращения матки. Прозерин в дозе 0,02 мг/кг (внутримышечно) вызывал резкое усиление спонтанной сократительной деятельности матки (рис. 17). Эльснер (Elsner, 1955) описал стимулирующее действие на матку *in situ* нескольких синтетических гомологов октаметилен-бис-(карбаминоил-м-триметиламмоний фенола; ВС-18).



Действие прозерина на матку устранялось холинолитиками, в особенности арпенолом и его четвертичными аналогами (З. А. Дроздова, 1951).

Из восьми холинолитиков наиболее выраженный антагонистический эффект оказывали препараты, содержащие в своей молекуле четвертичный атом азота. Среди третичных соединений заметную активность проявили арпенал и дифазин, обладающие преимущественно никотинолитическим действием, в то время как пентафен, являющийся менее сильным Н-холино-

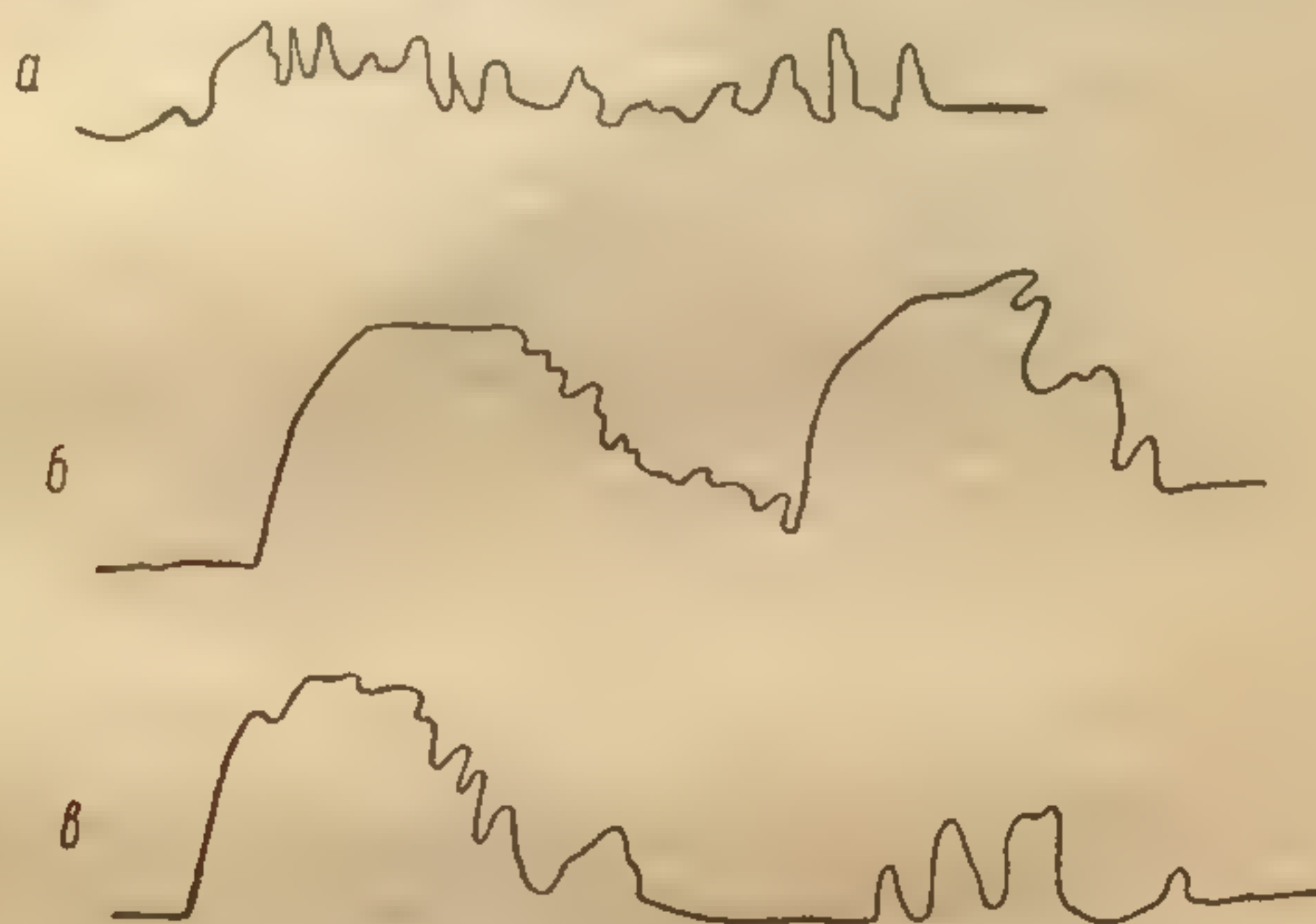


Рис. 17. Усиление спонтанных сокращений матки прозеринном и антагонизм с йодметилатом арпенала (З. А. Дроздова, 1957).

а — спонтанные сокращения; б — эффект прозерина (0,02 мг/кг); в — устранение эффекта прозерина йодметилатом арпенала (10 мг/кг).

литиком, был неэффективен. Это наводит на мысль, что спазмолитическое действие арпенала и дифазина, и в особенности их четвертичных солей, связано с блокирующим влиянием на нижний мезентериальный ганглий. Это подтверждается еще и тем, что атропин не влияет на действие прозерина на матку (М. Я. Михельсон, 1962).

Не исключена возможность, что в опытах *in situ* проявляются и гормональные влияния на матку, связанные с возбуждением прозеринном гипофиза, в котором, согласно данным А. А. Белоус (1950), имеются холинергические структуры.

Стимулирующее влияние прозерина на сокращения изолированной матки описано А. В. Савшинской (1951). В дальнейшем этот вопрос более подробно был изучен Л. В. Чугуновой (1958, 1962) и Н. А. Корчагиной (1962) в отношении фосфорорганических соединений. Согласно наблюдениям Л. В. Чугуновой, армин в концентрациях начиная от  $5 \cdot 10^{-7}$  оказывает на матку стимулирующее влияние. Наиболее чувствительными к армину



оказались матки беременных и родивших животных. Менее чувствительна девственная матка. По сравнению с прозерином эффект ФОС был значительно более продолжительным.

### ДЕЙСТВИЕ НА СИСТЕМУ ДЫХАНИЯ

Нарушения дыхания в картине отравления антихолинэстеразными веществами занимают ведущее место и являются непосредственной причиной смерти.

Многочисленные исследования показали, что эзерин и другие антихолинэстеразные вещества вызывают нарушения функции дыхания уже в ранних стадиях отравления и при введении животным сравнительно небольших доз веществ. Патогенез нарушений функции дыхания при отравлении антихолинэстеразными веществами представляется весьма сложным. Это связано с многогранностью их действия на различные звенья рефлекторной дуги. Рассмотрим четыре возможных вида действия антихолинэстеразных веществ на дыхание: 1) бронхоспазм, 2) действие на дыхательный центр, 3) возбуждение хеморецепторов каротидного клубочка, 4) паралич дыхательной мускулатуры.

#### Бронхоспазм

С тех пор как в 1903 г. Диксон и Бродье (Dixon, Brodie) показали, что эзерин отчетливо усиливает бронхоспазм, вызванный вагусной стимуляцией, накоплен огромный экспериментальный материал о действии антихолинэстеразных веществ на бронхи. Вряд ли представляет интерес перечисление всех работ, посвященных этому вопросу, тем более, что в большинстве из них были получены однотипные результаты. Целесообразнее остановиться на данных, проливающих свет на механизм бронхоспазма, его патогенетическую роль в расстройствах дыхания у различных видов животных, и особенностях действия на бронхи различных антихолинэстеразных веществ.

Бронхоспазм воспроизведен в опытах на различных видах животных путем введения им многих антихолинэстеразных веществ: эзерина (Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева, 1955, и др.), прозерина (Л. Г. Магазанник, 1957; Е. П. Успенская и Л. Г. Магазанник, 1957, и др.), ДФФ (King et al., 1957; Chary, Bocquet, 1958), ТЭПФ (Daly, 1957), табуна (Holmstedt, 1951; Chary, Bocquet, 1958), зарина (Johnson et al., 1958), паратиона (Johnson et al., 1958) фосфакола (Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева, 1955), армина (И. В. Семенов, 1957), пирофоса, изосистокса и его метилсульфометилата (И. В. Семенов и Н. К. Фруентов, 1957) и других веществ.

Тренделенбург (Trendelenburg, 1912) нашел, что эзерин сокращает изолированную бронхиальную мышцу. Эзерин ( $10^{-7}$ )



усиливает сокращения изолированного бронхиального кольца человека в ответ на введение ацетилхолина (Hawkin, Schild, 1951). Существует мнение, что бронхоспазм обязан своим происхождением действию антихолинэстеразных веществ на холинореактивные системы бронхов. Это доказывается тем, что бронхоспазм можно воспроизвести на изолированных (Bhattacharya, Rochet, 1956; King et al., 1957; Daly, 1957) и денервированных легких, а также тем, что он не устраняется перерезкой блуждающих нервов, но может быть подавлен атропином (Б. Б. Шугаев, 1957а, и др.). Бронхоспазм возникает и после перерезки диафрагмального нерва, что исключает прямое участие диафрагмы в его патогенезе (Holmes, Robins, 1954).

Однако опыты на изолированных легких говорят в пользу того, что бронхоспазм является периферическим эффектом антихолинэстеразных веществ и обусловлен угнетением холинэстеразы в бронхах. В то же время имеются некоторые факты, не укладывающиеся в эти представления. Так, Кинг и др. (King et al., 1957) не смогли вызвать бронхоспазм при перфузии легких морской свинки некоторыми активными ингибиторами холинэстеразы [N, N-диметилкарбамат-(2-окси-5-фенилбензил)-триметиламмоний бромид и N-п-хлорфенил-N-метилкарбамат м-оксифенил триметиламмоний хлорид].

Некоторые авторы на основании опытов с прозеринем считают, что в развитии бронхоспазма большую роль играет не только действие на периферические мионевральные синапсы, но и на ганглии (Е. П. Успенская, Л. Г. Магазанник, 1957; Daly, 1957). Возможно, что этот механизм имеет значение и при отравлении ФОС, однако прямых экспериментальных данных по этому вопросу нет. Следует, однако, иметь в виду, что согласно данным Е. П. Успенской и Л. Г. Магазанника в действии ФОС и прозерина на мускулатуру бронхов имеется различие. Так, бронхоспазм, вызванный ФОС, не устраняется перерезкой блуждающих нервов, в то время как прозериновый бронхоспазм снимается ваготомией, равно как и фармакологическим блокированием ганглиев. Бронхоспазм при отравлении антихолинэстеразными веществами развивается преимущественно вследствие увеличения чувствительности мускулатуры бронхов к ацетилхолину, а не в результате прямого действия на холинореактивные системы (Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева, 1957).

Возможности изучения бронхоспазма возросли после того, как была предложена методика регистрации сопротивления дыхательных путей (Konzett, Rössler, 1940; Т. М. Турпаев, 1953). Этот метод дает возможность точной графической регистрации избытка воздуха, не попавшего в легкие животного в процессе искусственного дыхания в результате возросшего сопротивления дыхательных путей.



Значительное число работ посвящено экспериментальному изучению бронхоспазма этим методом. Поскольку бронхоспастический эффект у различных антихолинэстеразных веществ однотипен и отличается только продолжительностью и временем наступления, мы ограничимся одним примером (рис. 18).

В отличие от опытов на изолированных препаратах легких, в данном случае сохраняется тонизирующее влияние блуждающих нервов. Полный прозериновый или фосфаколовый спазм сразу снимается их перерезкой

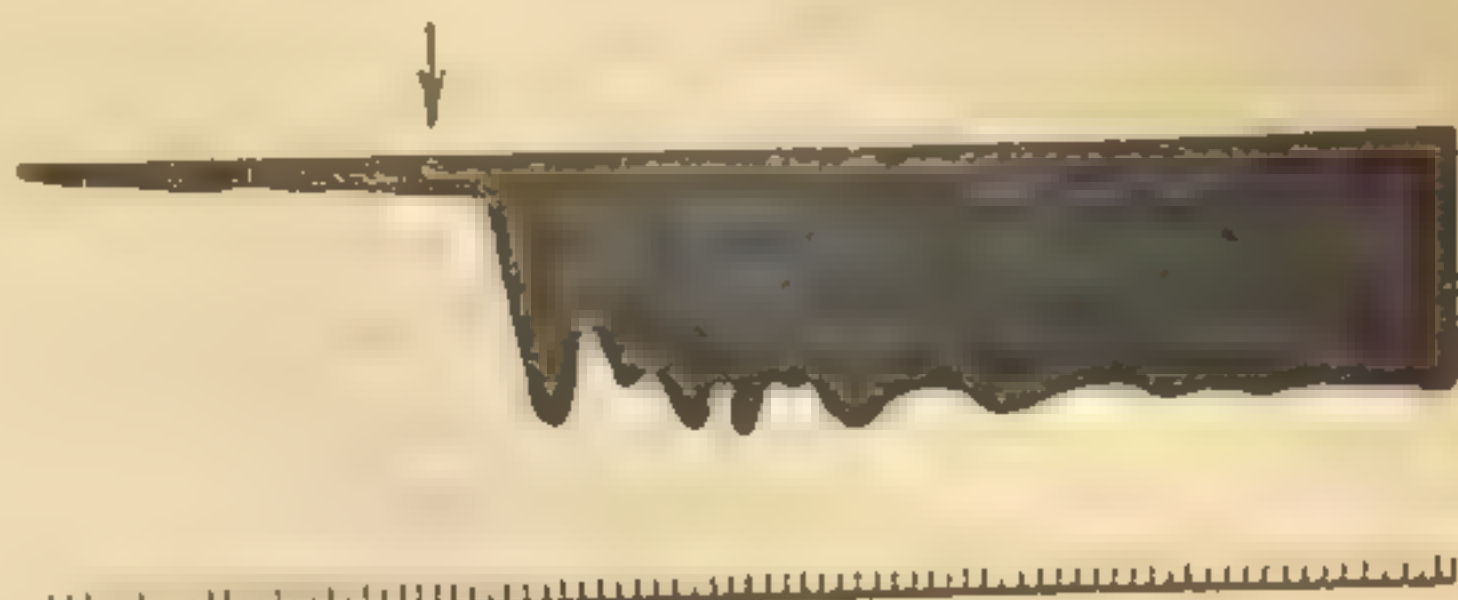


Рис. 18. Бронхоспазм, вызванный внутривенным введением кошке 0,1 мг/кг прозерина (Е. П. Успенская, 1957).

Регистрация (сверху вниз): тонус бронхиальной мускулатуры (показания пистон-рекордера); отметка времени (20 сек); стрелка — момент введения прозерина.

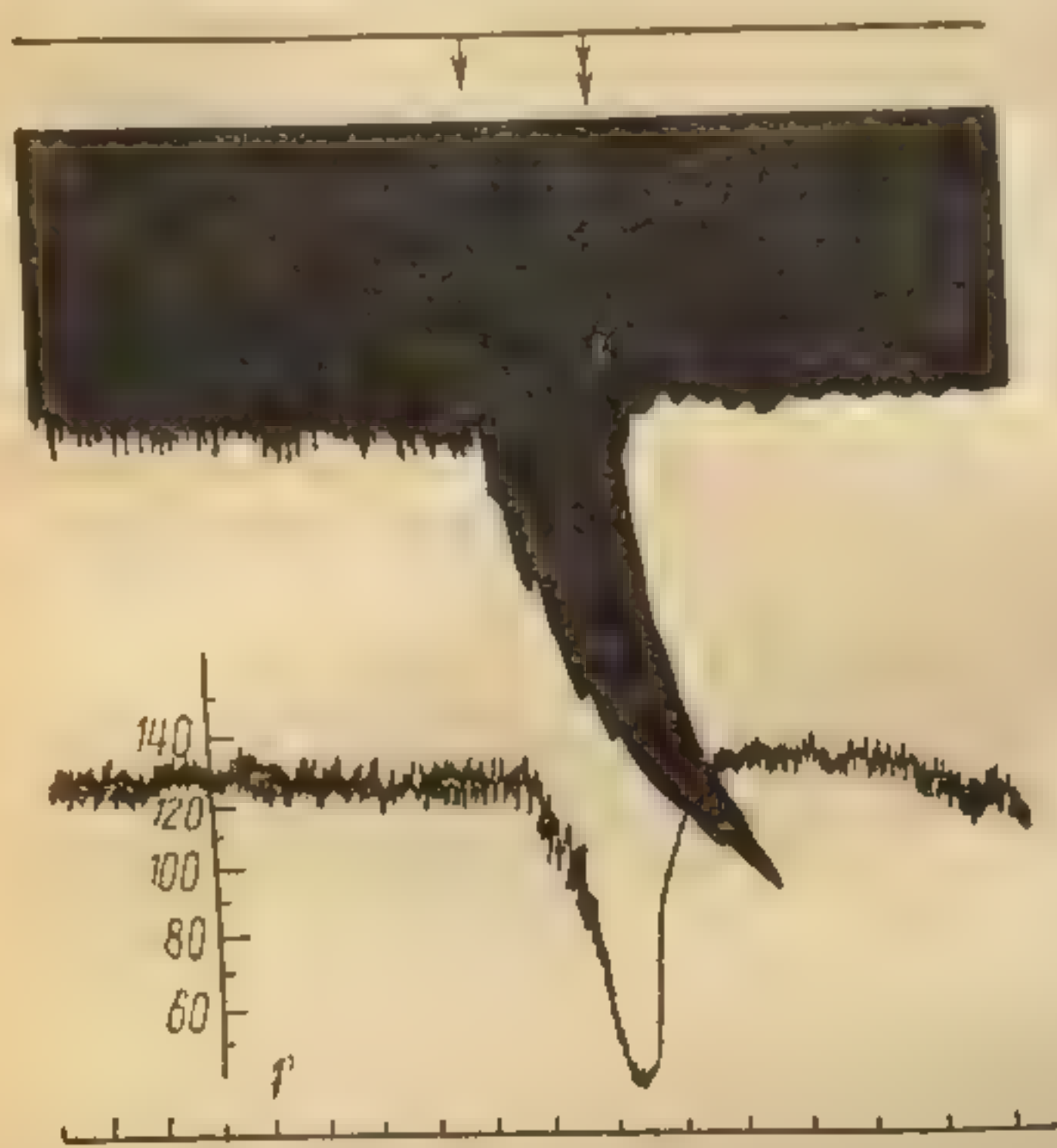


Рис. 19. Снятие перерезкой блуждающих нервов бронхоспазма, вызванного введением прозерина (Е. П. Успенская и Л. П. Магазанник, 1957).

Децеребрированная кошка. Дыхание исключено дитилином. Сверху вниз: регистрация бронхоспазма, кровяное давление, отметка времени. Одинарная стрелка — введение в вену 0,1 мг/кг прозерина; двойная стрелка — ваготомия.

(рис. 19). Это не противоречит на изолированных и денервированных легких, так как путем увеличения дозы антихолинэстеразного вещества и после перерезки блуждающих нервов можно получить бронхоспазм.

Пороговая доза прозерина (0,01 мг/кг), которая сама по себе не вызывает сужения просвета бронхов, облегчает развитие бронхоспазма в ответ на раздражение периферических отрезков блуждающего нерва. Это показывает, что в развитии прозеринового бронхоспазма основную роль играет антихолинэстеразное действие (М. Я. Михельсон, 1962). Есть основания, однако, полагать, что в больших дозах прозерин и другие четвертичные антихолинэстеразные препараты могут вызывать спазм гладкой мускулатуры бронхов за счет прямого (холиномиметического) действия. Впрочем, не исключено, что аналогичное

действие могут проявлять и третичные антихолинэстеразные вещества. В этом отношении заслуживает упоминания армин.



который в опытах И. В. Семенова вызывал спазм бронхов, трудно устранимый перерезкой блуждающих нервов. Согласно данным Чари и др. (Charu et al., 1958), эзерин и другие антихолинэстеразные вещества не только усиливают влияние на бронхи раздражения блуждающего нерва или фармакологического ацетилхолина, но и гистамина, что также трудно объяснить с позиций антихолинэстеразной теории. Как уже было указано, атропин снимает бронхоспазм, вызванный разными антихолинэстеразными веществами. Есть данные о том, что тетраэтиламоний и другие препараты, блокирующие передачу на ганглионарном уровне (арпенал и др.), оказывают аналогичное действие. В этих же дозах они антагонизируют с действием на бронхи никотина (Е. П. Успенская и Л. Г. Магазанник, 1957). По-видимому, благоприятное влияние на прозериновый бронхоспазм наркотиков также связано с их ганглиоблокирующей активностью (Л. Г. Магазанник, 1957).

Разница в действии на бронхи обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы в основном сводится к продолжительности действия, которая больше у необратимых ингибиторов. Различия в действии антихолинэстеразных веществ, принадлежащих к какой-либо одной группе, касаются эффективных доз и в меньшей степени продолжительности действия. Последняя зависит от прочности связи ингибитора с ферментом. Она выше у веществ, содержащих четвертичный атом азота. Особняком стоит группа так называемых не прямых ингибиторов холинэстераз (к последним относятся соединения, которые приобретают антихолинэстеразную активность в результате превращения в организме из неактивного в активное вещество). В соответствии со скоростью превращения таких соединений бронхоспастический эффект (как, впрочем, и другие виды действия) развивается постепенно, достигая своего максимума иногда только через 1—1,5 ч. В этом отношении показательны результаты, полученные И. В. Семеновым с октаметилом (1958) (рис. 20).

И. В. Семенов и Н. К. Фруентов (1957), исследовавшие бронхоспастическое действие ряда фосфорорганических соединений, установили прямую зависимость между способностью соединений угнетать истинную холинэстеразу и их влиянием на бронхи. Замена в молекуле ФОС атома кислорода, связанного с фосфором двойной связью, на атом серы вела, напротив, к ослаблению активности.

Наряду с бронхоспазмом антихолинэстеразные вещества вызывают ларингоспазм.

Бронхоспазм сопровождается усилением секреции бронхиальных желез, которая наряду с обильным слюноотечением создает дополнительно препятствие прохождению воздуха в легкие. Усиление секреции обусловлено преимущественным влиянием ФОС на холинореактивные системы желез. При оценке



действия ФОС на бронхиальную и слюнную секрецию следует также учитывать состояние центральной нервной системы. Так, в опытах Коллумбайна и Дирнубера (1955) влияние ФОС на секрецию было более значительным, если у животного развивались судороги.

Значение бронхоспазма в механизме смерти при отравлении ФОС расценивается достаточно серьезно. Холмстедтом (Holmstedt, 1951) показано, что наступление бронхоспазма при отравлении ФОС совпадает с резким уменьшением объема дыхания

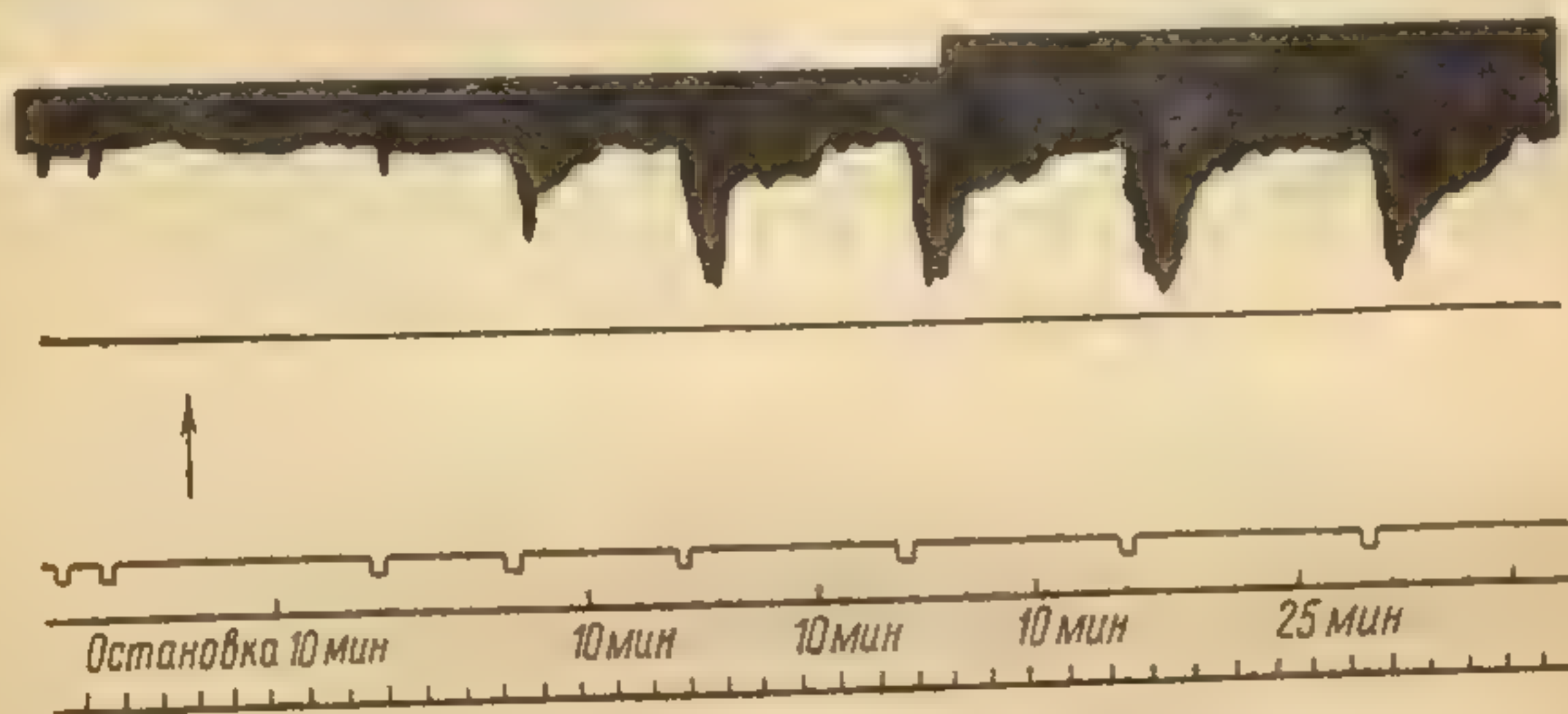


Рис. 20. Постепенное развитие у кошки спазма бронхов при введении октаметила (И. В. Семенов).

Децеребрированная кошка, дыхание выключено дитилином. Сверху вниз: регистрация бронхоспазма, линия максимального бронхоспазма, отметка раздражения блуждающего нерва, регистрация остановки кимографа, отметка времени. Стрелка — внутривенное введение 30 мг/кг октаметилтетраидопирофосфата. На протяжении  $1\frac{1}{2}$  ч бронхоспастический эффект раздражения блуждающих нервов нарастает.

и является одной из основных причин затруднения дыхания у животных в начальной фазе отравления. Бронхоспазм быстро и независимо от других расстройств функции дыхания приводит к нарушению легочной вентиляции, цианозу и асфиксии, подобно тому, как это наблюдается при отравлении ацетилхолином и его миметиками (Krop, Kunkel, 1954).

При оценке патогенетической роли бронхоспазма в отравлении антихолинэстеразными веществами необходимо учитывать неодинаковую чувствительность различных видов животных к бронхоспастическому действию. Джонсон и др. (Johnson et al., 1958) провели сравнительное изучение действия на бронхи пиратиона и зарина на двух видах животных — собаке и обезьяне. Авторы установили, что у собак при введении им двух ЛД<sub>50</sub> пиратиона или зарина сопротивление в дыхательных путях возрастает в значительно большей степени (в 4 раза и более), чем у обезьян. Это легко объяснить наличием у собак более развитой гладкой мускулатуры бронхов. Интересно, что при более высоких дозах сопротивление было меньшим. По мнению авторов,



нарушения дыхания у обезьян связаны главным образом с действием антихолинэстераз на дыхательный центр и дыхательную мускулатуру, а не на бронхи, в то время как у собак бронхоспазм имеет большее значение.

### Действие на дыхательный центр

Работами Гизелла и сотр. (Gesell et al., 1942, 1943, 1950) дано экспериментальное обоснование холинергической природы синаптической передачи в дыхательном центре. Наибольший для нас интерес представляют опыты авторов с эзеринем. Оказалось, что эзерин усиливает действие ацетилхолина, нанесенного на дно четвертого желудочка, и удлиняет рефлекторную реакцию, вызванную электрическим раздражением верхнего гортанного нерва и нерва Геринга. В дальнейшем авторы установили, что увеличение частоты электрического раздражения каротидного нерва, так же как и применение антихолинэстеразных веществ, усиливало интенсивность дыхания. Нанесение на дно четвертого желудочка эзерина или ДФФ также сопровождалось усилением дыхания. Таким образом, изучение действия на центральную нервную систему антихолинэстеразных веществ явилось одним из доказательств медиаторной роли ацетилхолина в дыхательном центре. Несмотря на сравнительно небольшой промежуток времени, прошедший после этих работ, современная фармакология уже располагает многочисленными данными о действии антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр.

При изучении токсичности ДФФ Кривой и сотр. (Krivoy et al., 1951a, б) установили, что в развивающемся при отравлении животных дыхательном параличе большая роль принадлежит центральным механизмам. Это нашло подтверждение в обнаружении антагонизма между атропином или скополамином и антихолинэстеразными веществами (Krivoy et al., 1951a; Douglas, Matthews, 1952). В дальнейшем существование центрального механизма нарушения дыхания при отравлении различными антихолинэстеразными веществами подтвердили многие другие авторы (Д. С. Пасков, 1958; Wright, 1954; Paulet, 1956; Metz, 1958; Schaumann, 1959; Stewart, 1959, и др.).

Наиболее сложным вопросом в изучении влияния антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр является установление истинной роли центрального механизма в процессе интоксикации, вызванной антихолинэстеразными веществами, и соотношения центральных и периферических эффектов.

Поле (Paulet, 1956) на основании собственных экспериментальных данных пришел к выводу, что с непосредственным действием антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр связано первоначальное возбуждение дыхания и последующее уменьшение дыхательного объема. Шауман (Schaumann, 1959)



связывает с действием на дыхательный центр угнетение дыхания, наблюдаемое при отравлении крыс фосфаколом. Однако эти авторы, так же как и Райт (Wright, 1954), изучавший центральные и периферические компоненты в нарушении дыхания, вызванном ТЭПФ, не внесли окончательной ясности в вопрос. Более удачной в этом отношении оказалась попытка Стюарта (Stewart, 1959; Stewart a. McKey, 1961). Автор задался целью разрешить дилемму: наступает ли смерть при отравлении антихолинэстеразными веществами от непосредственного угнетения дыхательного центра или от нервно-мышечного блока в дыхательной мускулатуре, для чего разработал специальную методику раздельной регистрации у крыс сокращений полосы диафрагмальной мышцы, лишенной кровоснабжения, но с сохраненной иннервацией, и остальной части диафрагмы с нормальным кровоснабжением и иннервацией. В результате автору удалось показать, что дыхательный центр более чувствителен к зарину по сравнению с дыхательной мускулатурой. Предварительное введение атропина защищало дыхательный центр от действия больших доз зарина (до 200 г/кг), при этом удавалось выявить периферические нарушения нервно-мышечной проводимости.

Значительный интерес представляют попытки установить зависимость между уровнем угнетения холинэстеразы в центре и степенью нарушений дыхания. Первую попытку такого рода предпринял Поле (Paulet, 1956) и пришел к отрицательным результатам. Однако Поле в своей работе допустил существенную методическую ошибку: он пытался вывести зависимость на основании сравнения эффектов большого числа антихолинэстеразных соединений со степенью угнетения фермента в продолговатом мозгу. Поскольку у одних из исследованных автором соединений могли преобладать центральные механизмы нарушения дыхания, а у других — периферические, нельзя было и ожидать корреляции показателей центральной активности.

Более успешной оказалась работа Метца (Metz, 1958), который исследовал ту же зависимость, но с использованием одного вещества, а именно ТЭПФ, которое он вводил не внутривенно, как это делал Поле, а непосредственно в мозг (в цистерну). Ему удалось наблюдать параллельное снижение рефлекторной возбудимости дыхательного центра (в ответ на раздражение нерва Геринга) и активности холинэстеразы тех отделов мозга, которые ответственны за функцию (продолговатый мозг, варолиев мост). Остановка дыхания наступила при падении активности холинэстеразы до 8—10% контроля.

Центральные расстройства дыхания, вызванные антихолинэстеразными веществами, могут быть предупреждены или сняты холинолитическими препаратами, обладающими центральным действием. Однако этот антагонизм имеет, по-видимому,



ограниченное значение, поскольку он проявляется только при сохранности периферических дыхательных приборов. Это убедительно показано Холмстедтом (Holmstedt, 1951) в опытах с табуном. Автор установил, что предварительное введение атропина животным защищает дыхательный центр от паралича до того момента, пока не наступит блок дыхательной мускулатуры и связанная с ним глубокая гипоксия. Возможно, именно этим и можно объяснить неудачные попытки некоторых авторов устранить дыхательный паралич, вызванный антихолинэстеразными веществами (Erdmann et al., 1955).

В действии третичных антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр, по-видимому, нет принципиальных различий. Тем не менее, соотношение между выраженностью центральных и периферических компонентов может быть неодинаковым. Естественно, что в случае преобладания периферических эффектов значение центрального действия на дыхательный центр снижается. В этом отношении заслуживает упоминания, например, паратион. Согласно данным Эрдмана и др. (Erdmann et al., 1955), только возбуждение дыхания связано с центральным действием паратиона; что касается паралича, то он имеет преимущественно периферическую природу.

Для проявления прямого действия на дыхательный центр большое значение имеет способность веществ проникать из крови в мозг (см. стр. 215). Можно допустить, что известные различия в действии на дыхательный центр антихолинэстеразных веществ связаны именно с неодинаковой способностью их проникать через гемато-энцефалический барьер. Это особенно отчетливо видно на примере ониевых аналогов ФОС, которые благодаря наличию положительного заряда у атома азота или серы почти не проникают из крови в мозг.

Шауман и Джоб (Schaumann, Job, 1958) в опытах на крысах исследовали влияние внутривенного введения фосфолина и его третичного аналога (препарат 217АО) на центральную регуляцию дыхания и нервно-мышечную проводимость. Фосфолин даже в больших дозах не оказывал влияния на дыхательный центр, в то время как его третичный аналог тормозил дыхание благодаря непосредственному влиянию на центральную нервную систему; восстанавливал дыхание после остановки, вызванной морфином, но не влиял на передачу возбуждения с нерва на мышцу. После введения атропина, который предупреждал центральное действие препарата 217АО, мог наступить паралич дыхательной мускулатуры. Различие в действии объясняется тем, что благодаря хорошей растворимости в липоидах третичного аналога фосфолина он легко проникает в центральную нервную систему; фосфолин же практически не проходит через гемато-энцефалический барьер и поэтому лишен центрального действия.



Известно, что при отравлении животных октаметилом и димефоксом, содержащими диалкиламиногруппы, смерть животных не сопровождается угнетением холинэстеразы мозга (Barnes, 1954; Okinaka, Doull et al., 1954), в соответствии с этим в их токсическом действии центральный фактор не имеет существенного значения (O'Brien, 1960).

Признавая возможность прямого действия антихолинэстеразных веществ на дыхательный центр, нельзя забывать о том, что в условиях целого организма функционирование центра может измениться в результате гипоксии. Так, по мнению Гейманса и Джекоба (Heymans, Jacob, 1947), возбуждение дыхательного центра при введении ДФФ собаке зависит от асфиксии, а не от прямого действия на дыхательный центр, так как введение яда в больших дозах в сонную артерию изолированной головы животного вызывает лишь легкое возбуждение дыхания. В рефлекторном возбуждении дыхательного центра тиофосом и метафосом, по-видимому, имеет значение нарушение функционирования каротидных клубочков.

#### Влияние на хеморецепторы каротидных клубочков

Известно, что в рефлекторной регуляции дыхания важную роль играют каротидные клубочки, которые реагируют возбуждением на понижение напряжения кислорода, на повышение парциального давления углекислоты и на повышение концентрации водородных ионов в артериальной крови, омывающей синокаротидную область. При введении животному токсических доз антихолинэстеразных веществ уже вследствие бронхоспазма наступает гипоксия, которая может привести к одышке и подъему кровяного давления независимо от возможного прямого влияния этих веществ на центральные регуляторные механизмы. Однако не исключено, что антихолинэстеразные вещества могут непосредственно возбуждать хеморецепторы каротидных клубочков.

Исчерпывающие материалы о влиянии различных фармакологических веществ, в том числе и антихолинэстеразных, на хеморецепторы каротидных клубочков приведены в монографии С. В. Аничкова и М. Л. Беленького (1962), поэтому мы лишь кратко остановимся на интересующих нас веществах.

Несмотря на то, что вопрос о возможной роли ацетилхолина как химического передатчика импульсов в каротидных клубочках все еще остается открытым, рассмотрение в этом аспекте действия антихолинэстеразных веществ закономерно хотя бы потому, что сам ацетилхолин оказывает специфическое влияние на клубочки.

Н. Г. Поляков-Станкевич еще в 1938 г. установил, что пропускание раствора эзерина в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  через изолиро-



ванный синус децеребрированной кошки сопровождается повышением чувствительности хеморецепторов к ацетилхолину, при этом сам эзерин в испытанных концентрациях определенного действия на клубочек не оказывал. Это объясняется тем, что в каротидных клубочках находится почти исключительно ложная холинэстераза и главное значение в специфическом обмене, по-видимому, принадлежит не ацетилхолину, а бутирилхолину и, возможно, другим сложным эфирам холина.

Механизм повышения чувствительности органов к ацетилхолину при избирательном угнетении ложной холинэстеразы не расшифрован, однако имеется достаточно экспериментальных обоснований для того, чтобы считать, что этот механизм имеет место не только в органах, содержащих как ложную, так и истинную холинэстеразу, но и в образованиях, содержащих преимущественно одну ложную холинэстеразу (каротидный клубочек).

Наибольшее число работ, в которых установлено холиносенсибилизирующее действие антихолинэстеразных веществ на изолированном клубочке, проведено с двумя веществами: эзерином и прозерином (С. С. Крылов, 1962; Schweitzer, Wright, 1938; Landgren, 1952; Heymans, Delanois et al., 1953, и др.). Резкого повышения чувствительности каротидного клубочка к ацетилхолину можно добиться введением избирательных ингибиторов ложной холинэстеразы — N-парахлорфенил-N-метилкарбамата метаоксифенилтриметиламмония (Casier, Vleschhouwer, 1952) и препарата Nu-683-диметилкарбаминового эфира 2-окси-5-фенилбензил-триметиламмоний бромида (Fernandes, 1949; Mazella, Migliaro, 1949).

Из фосфорорганических соединений преимущественным действием на ложную холинэстеразу обладает ДФФ, который, согласно данным Вербеке (Verbese, 1949), резко потенцирует действие ацетилхолина на каротидный клубочек. Это же относится к ТЭПФ (Douglas, 1952), который угнетает ложную холинэстеразу не менее сильно, чем ДФФ, но, в отличие от последнего, примерно в тех же дозах тормозит и истинную холинэстеразу.

Атанакович (Atanackovic, 1950, 1951) наблюдал повышение чувствительности клубочков к ацетилхолину под влиянием тетраметохининметиодида.

Д. С. Пасков (1958) в опытах с перфузией изолированного каротидного клубочка установил, что нивалин в концентрациях от  $2 \cdot 10^{-7}$  до  $10^{-4}$  в 20—200 раз повышает чувствительность клубочка к ацетилхолину.

Во всех этих исследованиях получены однотипные результаты, которые убедительно говорят о том, что многие антихолинэстеразные вещества благодаря ингибции ложной холинэстеразы в клубочке увеличивают его чувствительность к ацетилхолину, введенному извне. На вопрос о том, вызывают ли



антихолинэстеразные препараты сами по себе возбуждение клубочка, различные авторы дали противоречивые ответы. В то время как Гейманс и сотрудники (Heymans, 1946; Heymans, Delaunois et al., 1953) при введении различных антихолинэстеразных соединений в клетчатку, окружающую клубочки, наблюдали лишь незначительное рефлекторное возбуждение дыхания, Лильестранд и другие шведские фармакологи (Liljestrand, 1951; Langren et al., 1952) утверждают, что эзерин и другие антихолинэстеразные вещества обладают хорошо выраженным возбуждающим действием на хеморецепторы каротидных клубочков. Расхождения авторов в оценке возбуждающего действия антихолинэстеразных веществ на каротидные клубочки объясняются различными условиями опытов. В опытах Гейманса и сотрудников способ введения препаратов обеспечивал локальное действие на клубочки, в опытах Лильестранда и его сотрудников те же вещества вводились в общую сонную артерию, и при таком способе введения в крови животных неизбежно накапливался ацетилхолин; поэтому не исключено, что наблюдавшееся шведскими авторами возбуждение хеморецепторов клубочков связано с повышением их чувствительности к поступающему с кровью ацетилхолину. Не следует также забывать, что уретан, которым авторы наркотизировали животных, угнетает холинэстеразу.

Факт возбуждения дыхания в результате действия антихолинэстеразных веществ на хеморецепторы каротидного клубочка получил подтверждение в работе Ю. С. Кагана (1961). Он установил, что при введении животным малых доз тиофоса и меркаптофоса в общую сонную артерию с большим постоянством наблюдается возбуждение дыхания. Этот же эффект автору удалось воспроизвести путем введения веществ в изолированный каротидный синус, сохраняющий с организмом только нервную связь. На основании того, что возбуждение дыхания возникло при повторном введении в изолированный синус относительно высоких концентраций препаратов, т. е. в условиях заведомо полного угнетения холинэстеразы, автор полагает, что возбуждение клубочков есть следствие прямого действия препаратов на Н-холинореактивные системы клубочка.

### Влияние на дыхательную мускулатуру

Вопрос о влиянии антихолинэстеразных веществ на нервно-мышечные синапсы будет рассмотрен нами ниже. Здесь же необходимо остановиться на нарушениях функции дыхательной мускулатуры, поскольку они могут иметь серьезное значение в патогенезе расстройств дыхания, вызываемых антихолинэстеразными веществами. Уже в результате обычных наблюдений за течением отравления антихолинэстеразными веществами было



подмечено, что наряду с фибриллярными мышечными подергиваниями и тремором отдельных мышечных групп у животных снижается интенсивность сокращения межреберных мышц. При вскрытии у таких животных грудной клетки можно наблюдать, как фибрилляции распространяются на диафрагму, движения которой ослабевают вплоть до полного прекращения.

Расстройства нервно-мышечной функции при отравлении эзерином столь очевидны, что это вещество первыми же исследователями наравне с кураре было причислено к паралитическим ядам (Е. А. Пеликан, 1878).

В настоящее время твердо установлено, что нервно-мышечный блок, вызываемый антихолинэстеразными веществами, обусловлен угнетением холинэстеразы непосредственно в нервно-мышечном синапсе (точнее, двигательной пластинке), что приводит к местному повышению концентрации ацетилхолина и вызывает сначала перевозбуждение концевой пластинки, а затем ее полную деполяризацию. Не останавливаясь здесь подробно на механизме нервно-мышечного блока и возможностях его устранения (см. об этом на стр. 200), приведем некоторые данные, уточняющие значение и место этих нарушений в расстройствах функции дыхания.

Несмотря на давние указания на фатальность нервно-паралитических эффектов эзерина, до последнего времени им не придавали большого значения и основное внимание уделяли стимулирующему влиянию антихолинэстеразных веществ на мышцы с целью изыскания эффективных средств для лечения миастении. С синтезом высокотоксичных фосфорорганических соединений интерес к действию антихолинэстеразных веществ на дыхательную мускулатуру возрос. За последнее десятилетие появилось большое количество экспериментальных исследований, в которых это действие подвергнуто специальному изучению (Barnes, Duff, 1953; De Candole et al., 1953; Douglas, Matthews, 1952; Holmes et al., 1953, 1955; Holmstedt, 1951; Meer, Meeter, 1956; Meeter, 1958; Schaumann, Job, 1958; Wright, 1954).

В этих исследованиях паралич дыхательной мускулатуры был воспроизведен на различных видах животных (крысы, кролики, собаки) с помощью ряда антихолинэстеразных веществ (ДФФ, ТЭПФ, табун, зарин, фосфолин и др.) и методик. При этом было установлено, что наиболее чувствительны к нервно-мышечному параличу крысы и кролики, кошки и собаки обладают меньшей чувствительностью, у обезьян диафрагмальные и межреберные мышцы относительно устойчивы к действию антихолинэстеразных веществ (De Candole et al., 1953).

Блок дыхательной мускулатуры зависит от действия яда на нервно-мышечные синапсы, так как воспроизводится в опытах на изолированном диафрагмальном препарате и не устраняется искусственным дыханием. Многие авторы отводят пара-



личу дыхательной мускулатуры при отравлении антихолинэстеразными веществами видное место среди летальных симптомов интоксикации (Douglas, Matthews, 1952; Barnes, 1953; Bidstrup, Bonnel, 1954, и др.). Значение этого фактора возрастает с увеличением дозы яда, а также в случае хронической интоксикации. Следует отметить, что ФОС могут вызвать паралич нервно-мышечной проводимости и в других мышцах, однако для воспроизведения этого эффекта требуется внутриартериальное введение больших количеств ФОС, значительно превышающих их абсолютно смертельные дозы.

Нарушения нервно-мышечной проводимости, вызываемые ФОС, в значительной степени зависят от угнетения активности холинэстеразы и резкого увеличения чувствительности поперечнополосатых мышц к ацетилхолину. Это подтверждается опытами Холмса и Робинса (Holmes, Robins, 1955), которым удалось устранить нервно-мышечный блок диафрагмы, вызванный ФОС, применяя вещества, восстанавливающие активность холинэстеразы.

Таким образом, в нарушении функции дыхания при отравлении ФОС принимают участие различные механизмы, которые в зависимости от ряда условий (химическое строение вещества, доза, вид животного) могут иметь неодинаковое значение. Так, в легких случаях на первый план выступают явления умеренного сужения бронхов и одышки вследствие прямого действия на дыхательный центр и возбуждения хеморецепторов каротидных клубочков. Дальнейшее увеличение дозы приводит к усилению сужения бронхов, асфиксии и изменению возбудимости дыхательного центра вплоть до его паралича. Параллельно, в случае введения больших доз, может возникнуть блок синаптической передачи в дыхательной мускулатуре.

Вряд ли можно себе представить в условиях целого организма изолированное действие каждого из 3 описанных механизмов нарушения дыхания. Исключение, возможно, представляет молниеносная форма отравления, когда внезапно наступает паралич дыхательного центра. В других случаях, несомненно, следует учитывать все три механизма нарушения дыхания с превалированием того или другого в зависимости от ряда конкретных условий. Важно, в частности, учитывать видовую чувствительность животных. У кроликов, например, расстройства дыхания протекают под знаком превалирования паралича дыхательной мускулатуры, для кошек типичен бронхоспазм, для обезьян — центральный паралич дыхания.

Преобладание тех или иных механизмов нарушения дыхательной функции зависит от химического строения антихолинэстеразных веществ. Для липоидорастворимых антихолинэстеразных веществ более характерно центральное действие; прозерин, ониевые фосфорорганические соединения и бис-четвер-



тичные обратимые ингибиторы вызывают преимущественно периферические расстройства (бронхоспазм и нервно-мышечный блок).

Для полноты характеристики патогенетических факторов нарушения дыхания, вызываемого антихолинэстеразными веществами, необходимо кратко остановиться на падении кровяного давления. Падение кровяного давления, наступающее при тяжелых формах отравления и связанное с сердечной слабостью и расширением сосудов внутренних органов, приводит к гипоксии. Эти явления обычно развиваются параллельно с вышерассмотренными нарушениями дыхания, но в дальнейшем «порочный» круг замыкается: гипоксия прогрессивно ухудшает состояние сердечно-сосудистой системы, а это в свою очередь приводит к нарастанию кислородного голодания. Сильный бронхоспазм, кроме того, осложняется отеком легких, создающим дополнительные циркуляторные расстройства в малом кругу кровообращения.

#### ДЕЙСТВИЕ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Нарушения кровообращения составляют одну из характерных особенностей действия антихолинэстеразных веществ на организм животных. Своим происхождением они обязаны изменениям функционального состояния сердца и тонуса сосудов. Здесь необходимо учитывать возможность действия препаратов на холинергические структуры нервных центров, регулирующих тонус сосудов, ганглионарный аппарат, холинореактивные системы сосудов, эндокринную регуляцию. В оценке этого влияния важное значение имеют также и такие факторы, как вид животного, дозы яда, способ введения, его способность проникать в центральную нервную систему, состояние дыхания. Остановимся на этих вопросах более подробно.

#### Изменения кровяного давления

При рассмотрении действия антихолинэстеразных веществ на кровяное давление удастся отметить следующую закономерность: большие (смертельные дозы) вызывают падение кровяного давления, которому обычно предшествует кратковременная гипертония; действие несколько меньших доз, напротив, нередко сопровождается повышением кровяного давления.

#### Гипотензивные эффекты

Согласно данным Дэли и Райта (Daly a. Wright, 1956, 1957), эзерин в дозе 0,1—0,3 мг/кг, ТЭПФ (0,1—0,3 мг/кг) и зарин в дозе 25—35 γ/кг при внутривенном введении вызывают у собак



урежение сердечного ритма и падение кровяного давления. Таким же действием обладают ДФФ (Modell, Krop, 1946; Heymans, 1947; Lundholm, 1949), табун (Holmstedt, 1941), тиофос (Ю. С. Каган, 1961; Salle, 1950; Erdmann, Lendle, 1958), хлортион, малатион, пирофосфат (Bagdon, Du Bois, 1955), меркаптофос (Ю. С. Каган, 1961) и др. антихолинэстеразные вещества.

В дозах, не вызывающих значительных изменений уровня кровяного давления, антихолинэстеразные препараты оказывают потенцирующее влияние на гипотензивный эффект ацетилхолина. Согласно данным Багдона и Дюбо (1955), различные ФОС усиливают мускариноподобное действие ацетилхолина на кровяное давление в 10—30 раз.

Патогенез гипотензивного эффекта антихолинэстераз изучен довольно подробно. Из причин, вызывающих снижение уровня артериального кровяного давления, большинство авторов на первое место ставит ослабление сердечной деятельности. Второй важной причиной является возможное преобладание сосудорасширяющего влияния над имеющим место сужением периферических сосудов.

Особое значение в возникновении гипотензивного эффекта антихолинэстеразных веществ имеют нарушения дыхания, постоянно наблюдаемые при отравлении животных этими веществами. Это видно хотя бы из того, что при переводе животного на искусственное дыхание у него восстанавливается кровяное давление и, наоборот, в случае выключения искусственного дыхания тотчас выявляются нарушения кровообращения. Однако и при обеспечении искусственного дыхания можно в эксперименте вызвать сильное падение кровяного давления. Для этого необходимо увеличить дозу антихолинэстеразного вещества.

Проведенный Дэли и Райтом (1956) физиологический анализ показал, что сужение периферических сосудов зависит от повышения симпатического тонуса вследствие усиленного освобождения гормонов из надпочечника. За счет этого эффекта осуществляется, в частности, влияние антихолинэстеразных веществ на селезенку. Так, по данным Скотта (Scott, 1957), внутривенное введение собакам ТЭПФ вызывает отчетливое сокращение селезенки, сопровождающееся повышением уровня гематокрита. Таким образом, этот эффект должен быть причислен к Н-холиномиметическому действию антихолинэстераз.

Стюарт и Маккей (Stewart, McKay, 1961) установили, что у наркотизированных крыс медленное внутривенное введение зарина при достижении дозы 35—40  $\mu$ /кг приводит к остановке дыхания на фоне повышенного артериального давления и нормальной нервно-мышечной проводимости. После включения аппарата искусственного дыхания давление постепенно падает, брадикардия углубляется и развивается коллапс, который яв-



ляется причиной смерти. Ваготомия не предупреждает развития брадикардии. Атропин в дозе 10 мг/кг восстанавливает нормальный сердечный ритм и кровяное давление, которое больше не снижается, несмотря на продолжающееся введение зарина до суммарной дозы 178 γ/кг. Наиболее вероятной причиной коллапса и гибели крыс при продолжающемся искусственном дыхании авторы считают накопление ацетилхолина в самой сердечной мышце. Накопление его в циркулирующей крови может явиться отягощающей причиной.

Ю. С. Каган (1962) установил, что вызываемая тиофосом и меркаптофосом у кошек брадикардия и прогрессирующее падение кровяного давления могут быть устранены четвертичными холинолитиками в дозах, не оказывающих влияния на центральную нервную систему.

### Гипертензивные эффекты

Мендес и Равин (Mendez, Ravin) в 1941 г. в опытах на атропинизированных кошках показали, что эзерин вызывает повышение кровяного давления. В дальнейшем этот эффект был воспроизведен со многими другими антихолинэстеразными веществами: прозерин (Grob, Harvey, 1950; Hilton, 1961; Korpani, Karcmar, 1951; Long et al., 1960; Reardon et al., 1947; Salerno, Coon, 1950; Varagic, 1955), ДФФ (Dirnhuber, Cullumbine, 1955; Korpani, Karcmar, 1951; Salerno, Coon, 1950), ТЭПФ (Korpani, Karcmar, 1951; Paulet, 1954; Salerno, Coon, 1950), зарин (Dirnhuber, Collumbine, 1955) и др.

Применяя фармакологические вещества, выключающие сосудистую регуляцию на различных уровнях, Поле (1954) в опытах с ТЭПФ установил, что повышение кровяного давления обусловлено действием главным образом на центры продолговатого и спинного мозга. В дальнейшем Поле и Шепдрайверу (Paulet, Schaeprdryver, 1959) удалось воспроизвести типичный гипертензивный эффект после введения зарина в условиях изолированного кровоснабжения головы собаки и таким образом доказать его центральное происхождение.

Аналогичное объяснение механизма возникновения прессорного действия эзерина и прозерина приводят Эйкштедт и др. (Eickstedt, Erdmann, Schaefer, 1955) на основании своих опытов на децеребрированных и декапитированных кошках.

У атропинизированных собак антихолинэстеразные вещества вызывают только прессорный эффект.

Д. С. Пасков считает, что вызываемое нивалином повышение кровяного давления связано с действием на симпатические ганглии, мозговой слой надпочечников и сосудодвигательные центры продолговатого и спинного мозга. Центральный механизм может включаться в процесс как в результате прямого действия



инвалина, так и в результате рефлекторных влияний, исходящих из хеморецепторов каротидного клубочка, рецепторов кишечника и др. Ю. С. Каган (1961) наблюдал гипертензивный эффект после введения кошкам в сонную артерию меркаптофоса и тиофоса. Этот эффект устранялся гексонием, но сохранялся после удаления надпочечников.

Джонсон, Гольд и Фриман (Johnson, Gold, Freeman, 1958) установили, что паратион и зарин вызывают в токсических дозах у собак и обезьян одинаковые изменения со стороны сердечно-сосудистой системы. Однако у обезьян не отмечается фазы гипертензии во время развития асфиксии.

Прессорное действие эзерина, ДФФ, ТЭПФ и зарины было отчетливо воспроизведено также в опытах на крысах (Dirnhuber, Cullumbine, 1955; Lesic, Varagic, 1961; Medokovic, Varagic, 1957; Stewart, McKay, 1961; Varagic, 1955). В опытах применялись различные методические подходы для установления механизма гипертензивного действия антихолинэстеразных веществ (фармакологические анализаторы, удаление надпочечников, удаление кожи с целью исключения участия периферических сосудов и др.). Перечислим наиболее важные результаты, полученные в этих исследованиях: 1) повышение кровяного давления наблюдается и после адреналэктомии; 2) исключение участия в гемодинамических реакциях кожных сосудов (удаление всей кожи) приводит к тому, что антихолинэстеразные вещества вместо повышения вызывают понижение кровяного давления; 3) гексоний мало изменяет действие антихолинэстеразных веществ на кровяное давление; 4) четвертичные антихолинэстеразные вещества, которые плохо проникают в центральную нервную систему, не вызывают подъема кровяного давления;

Таблица 21

**Влияние антихолинэстеразных веществ на кровяное давление**

Гипотензивный эффект	Гипертензивный эффект
Возникает преимущественно в результате периферического действия токсических доз, так как он: 1) сохраняется при перерезке блуждающих нервов, 2) устраняется атропином и четвертичными холинолитиками, не проникающими в мозг.	Возникает преимущественно в результате действия субтоксических доз, а также в первой фазе действия токсических доз на сосудодвигательные центры продолговатого и спинного мозга, так как воспроизводится в условиях изолированного кровоснабжения мозга и на адреналэктомизированных животных; не вызывается четвертичными антихолинэстеразными веществами, которые не проникают в мозг, и соответственно не устраняется четвертичными холинолитиками, в то время как атропин и другие третичные холинолитики эффективны.



5) дибенами устраняет гипертензивное действие антихолинэстеразных веществ (аналогичным образом действует резерпин при длительном предварительном введении и в меньшей степени бретилий и иохимбин).

Основной вывод, который делают авторы из этих фактов, состоит в признании центрального происхождения гипертензии, вызываемой антихолинэстеразными веществами. При этом особое значение некоторые авторы приписывают центральной активации адренергических нервных механизмов.

Общая характеристика влияния антихолинэстеразных веществ на кровяное давление представлена в табл. 21.

### Действие на сердце

Действие антихолинэстеразных веществ на сердце изучалось многими авторами. В 1935 г. — 12 лет спустя после того, как Леви опубликовал результаты своих блестящих опытов, доказывающих существование в сердце холинергической передачи, — Бак (Васq) установил, что эзерин усиливает хроно- и инотропные эффекты, вызванные раздражением блуждающего нерва и введением ацетилхолина. Эффекты эзерина и других антихолинэстеразных веществ изучались в многочисленных опытах на изолированном сердце, на сердечно-легочном препарате и в условиях целого организма. Детальное описание результатов исследований подобного рода можно встретить у Т. М. Турпаева (1962), Берна (1961) и других авторов. Не считая возможным подробно останавливаться на этих вопросах, мы ограничимся фармакологической характеристикой эффектов антихолинэстеразных веществ на сердце и попробуем определить их место в нарушениях кровообращения, наблюдаемых при воздействии этими агентами на целый организм.

Наиболее характерными проявлениями действия антихолинэстеразных веществ на сердце являются брадикардия и снижение силы сокращений миокарда. Эти эффекты постоянно отмечаются в случае применения субтоксических и токсических доз любых антихолинэстеразных веществ и выявляются различными методами (ЭКГ, запись сокращений сердца на кимографе, изменение величины работы сердца и потребления кислорода). Особенно чувствительным показателем действия антихолинэстеразных веществ на сердечно-сосудистую систему, по мнению Холмстедта (Holmstedt, 1951), является снижение величины работы сердца, наблюдаемое еще до изменения кровяного давления (рис. 21).

Убедительные данные о действии антихолинэстеразных веществ на сердце были получены на сердечно-легочном препарате. В этих опытах обычно перерезали блуждающие нервы и тем самым исключали влияние центральной нервной системы.



Рис. 21. Влияние атропина на работу сердца, потребление кислорода и кровяное давление (Holmstedt, 1951).  
а — без атропина; б — то же, что а, но с атропином. На оси ординат — значения в % к исходному уровню за 1 мин.  
1 — потребление кислорода; 2 — работа сердца; 3 — кровяное давление.

связок было показано, что атропин замедляет их сокращение. В опытах на изолированном сердце (Kleinfeld, 1951) было показано, что ТЭПФ в концентрации 10<sup>-6</sup> г/мл замедляет ритм и останавливает ТЭПФ и в высоких концентрациях. В опытах на сердце человека (Holt, 1961) было показано, что ТЭПФ в концентрации 10<sup>-6</sup> г/мл замедляет ритм и останавливает ТЭПФ и в высоких концентрациях. В опытах на сердце человека (Holt, 1961) было показано, что ТЭПФ в концентрации 10<sup>-6</sup> г/мл замедляет ритм и останавливает ТЭПФ и в высоких концентрациях.



Эзерин в концентрации  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М уменьшал частоту сердечных сокращений с 118 до 32 ударов, т. е. на 73%, аналогичным действием обладали прозерин и фосфакол (Берн, 1956). Добавление небольших количеств атропина (10—20) устраняло эффект эзерина (рис. 22). Интересно отметить, что ацетилхолин был менее активен, чем эзерин. Аналогичный эффект легко воспроизводится на изолированном сердце (Burn, 1956) и на предсердиях (Burn, Kottegoda, 1953).

В опытах на изолированных ушках предсердий морских

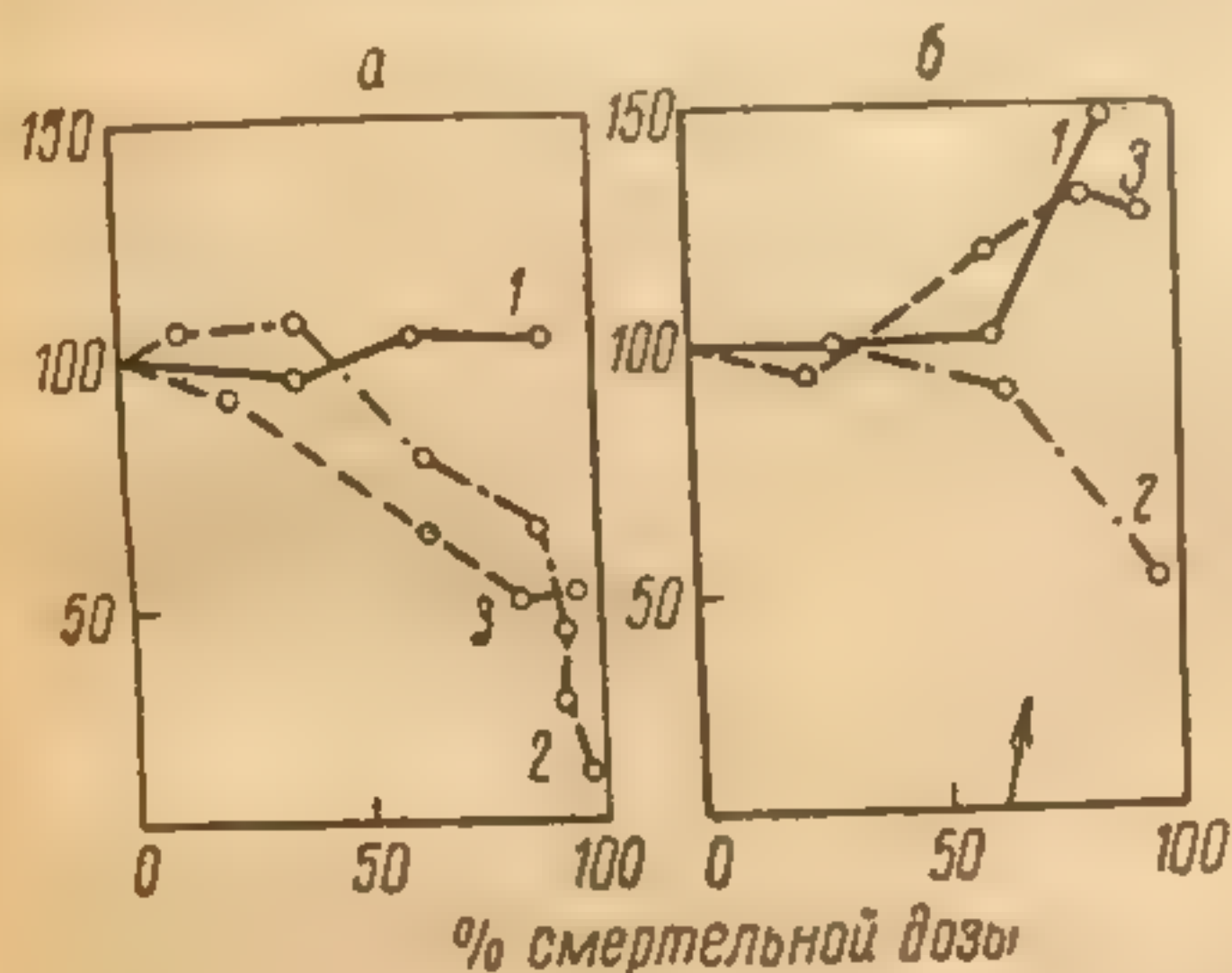


Рис. 21. Влияние табуна на величину работы сердца, потребление кислорода и кровяное давление кролика (Holmstedt, 1951).

а — без атропина; б — то же после введения атропина. На оси ординат — изменения показателей в % к исходному уровню, принятому за 100.  
1 — потребление кислорода; 2 — кровяное давление; 3 — работа сердца. Стрелка — введение атропина.

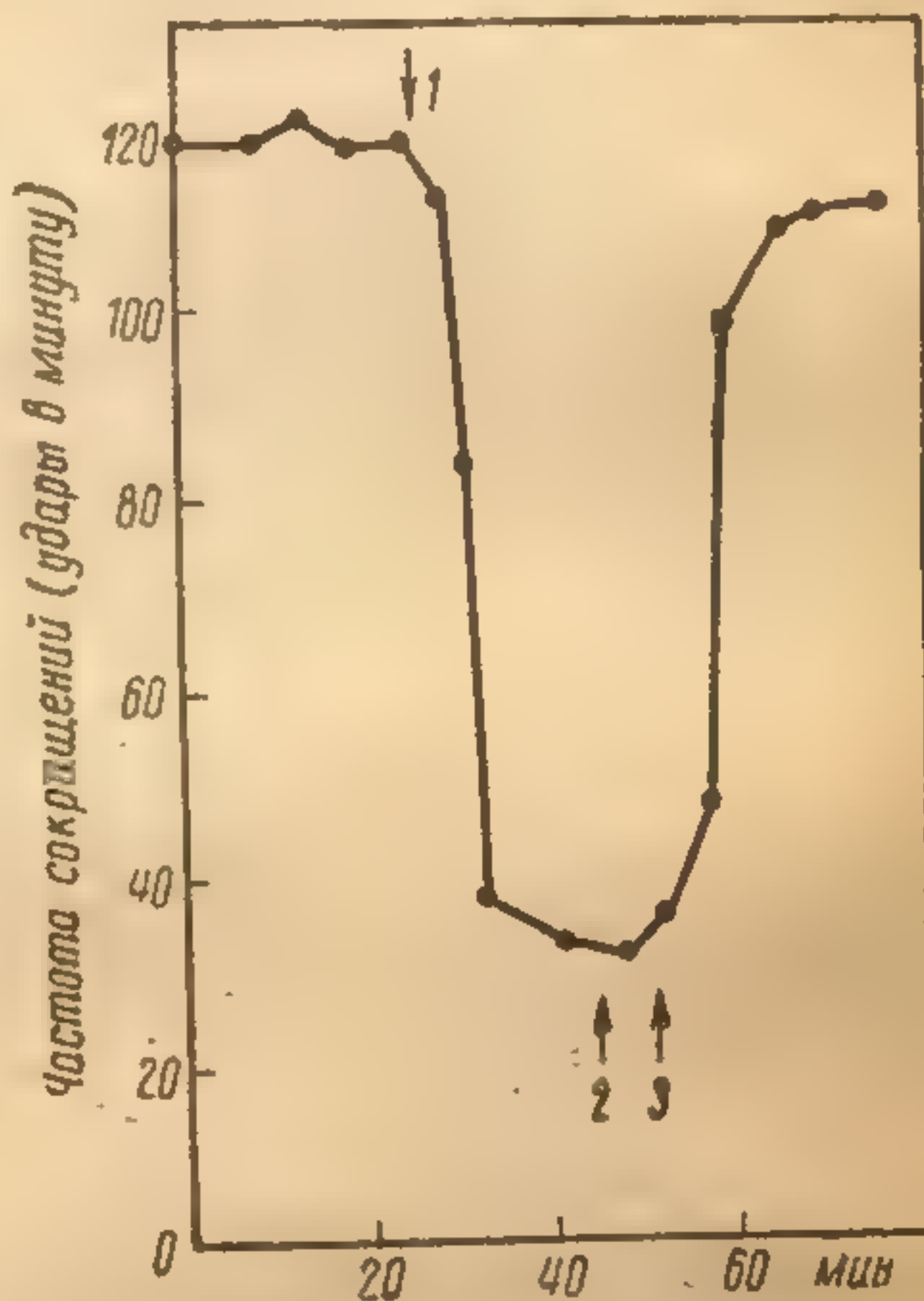


Рис. 22. Влияние эзерина на частоту сокращений сердца и антагонизм с атропином. Опыт на сердечно-легочном препарате (Берн, 1961).

1 — введение эзерина в сосуд с кровью с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация составляла  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М; 2 — введение 5γ атропина; 3 — введение 10γ атропина.

свинок было показано, что фосфакол в концентрации  $4 \cdot 10^{-6}$  М замедляет их сокращения, причем это действие снимается атропином или ПАМ (Bethe и др., 1955). Клинфелд, Меджин и Стейн (Kleinfeld, Magion, Stein, 1960), используя микроэлектродную технику, изучали влияние ТЭПФ на мембранные потенциалы изолированного предсердия кроликов и установили, что ТЭПФ в концентрации  $3,5 \cdot 10^{-7} — 7 \cdot 10^{-5}$  М вызывает замедление ритма и остановку сокращений предсердия, не изменяя потенциалы покоя и ускоряя фазу реполяризации. ПАМ снимал действие ТЭПФ и восстанавливал работу предсердий.

Несколько иные результаты получили Такаори и др. (Takaori et al., 1961). В опытах с регистрацией потенциалов изолированной



полоски предсердий кролика авторы установили, что вызываемое эзерином и паратионом снижение частоты сокращений и уменьшение длительности потенциалов действия и фазы реполяризации устраняется атропином, но не реактиватором (ПАМ). На этом основании авторы полагают, что действие антихолинэстеразных веществ в данном случае зависит от их прямого холиномиметического действия. Более высокие концентрации ( $10^{-4}$ ) таких ФОС, как ДФФ, ТЭПФ и фосфакол, уменьшали сердечные сокращения и снижали их амплитуду. Это блокирующее действие высоких концентраций ФОС не устранялось атропином (Burgen et al., 1949; Salerno, Coon, 1949; Bethe et al., 1957).

ФОС не изменяли спонтанных сокращений изолированного препарата аорты, но потенцировали действие ацетилхолина. В больших концентрациях ФОС не только не оказывали такого влияния, но, напротив, антагонизировали с действием ацетилхолина (Nalss, 1956). Н. Л. Богоявленская (1953) также установила «атропиноподобное» действие эзерина на изолированное сердце.

Из сказанного видно, что только эффекты низких концентраций укладываются в антихолинэстеразный механизм действия; что касается высоких доз, то, возможно, они прямым образом расслабляют мышцы.

В опытах некоторых авторов ингибиторы не вызывали брадикардии на изолированном сердце. Однако это не противоречит антихолинэстеразной теории. Как показали Эрдманн и Буркхардт (Erdmann, Burkhardt, 1960), отсутствие брадикардии на изолированном сердце связано исключительно с недостаточным снабжением сердца кислородом при таком методе исследования. Если же авторы создавали условия, обеспечивающие достаточное снабжение изолированного сердца теплокровного животного кислородом (повышение давления в перфузионной системе или добавление к перфузату гемоглобина в концентрации 0,66%), то фосфакол вызывал брадикардию.

### Изменения электрокардиограммы

Согласно данным Ю. С. Кагана (1961), антихолинэстеразные фосфорорганические соединения вызывают замедление сердечной деятельности и увеличение высоты зубца R. Эти изменения отмечаются при введении препаратов в дозах, не вызывающих видимых признаков интоксикации, и свидетельствуют о раннем повышении тонуса блуждающего нерва. В отдельных опытах имела место неполная атриовентрикулярная блокада. Аналогичный эффект наблюдал И. В. Комиссаров (1955). Изменение величины зубцов P и T, а также смещение сегмента S—T выше изоэлектрической линии позволяют предположить



наличие в этих случаях изменений коронарного кровообращения. Холинолитики (тропадин и пентафен) в опытах Ю. С. Кагана (1961) предупреждали развитие нарушений сердечной деятельности.

Подробное исследование изменений ЭКГ при отравлении табуном провели на кроликах болгарские ученые С. Т. Петров и Л. Кръестанов (1962). При легкой степени интоксикации на ЭКГ изменялись главным образом зубцы *P* и *T* (уменьшение амплитуды зубцов, в отдельных случаях сглаживание и инверсия *T*). Брадикардия отмечалась только в тяжелых случаях интоксикации, при этом зубец *T* становился отрицательным, а *P* исчезал. В отдельных случаях отмечалась желудочковая экстрасистолия, снижение интервала *ST* ниже изоэлектрической линии в сочетании с инверсией зубца *T* и уменьшением комплекса *QRS*.

Электрокардиографические исследования на кроликах, проведенные Д. С. Пасковым (1958) с нивалином, показали, что этот алкалоид в дозах 0,1 мг/кг и выше вызывает урежение ритма сердечных сокращений, почти не изменяя общего вида ЭКГ. Наблюдалось лишь небольшое удлинение интервала *PQ* и некоторое увеличение вольтажа зубца *T*.

Ренэ и Дельга (Rene, Delga, 1954, 1955) вызывали у морских свинок остановку сердца введением эзерина, прозерина и ДФФ (препараты вводились путем медленной инфузии растворов в следующих дозах: эзерин 30γ, прозерин 15γ и ДФФ 250γ в минуту). Остановка сердца наступала в разные сроки — например, в случае введения ДФФ через 51 мин. Это время можно было значительно уменьшить при совместном применении антихолинэстеразных веществ с хлоридом калия. Синергизм между ДФФ и хлоридом калия был показан теми же авторами в опытах на собаках. Этим опытам отчасти противоречат данные Монтоммери и др. (Montgomery et al., 1954), которым удавалось прозеринном снять у собаки желудочковую фибрилляцию, возникновение которой авторы связывают с повышением содержания калия в миокарде при ацидозе.

Убедительные данные о характере изменений ЭКГ получены в опытах на сердечно-легочном препарате. В опытах Берна (1961) эзерин и подобные ему вещества, наряду со снижением частоты сердечных сокращений на сердечно-легочном препарате, замедляли скорость проведения каждого импульса, так как интервал *PQ* увеличивался. Когда ингибиторы применялись в более высоких концентрациях, они вызывали полный атриовентрикулярный блок: на ЭКГ можно было видеть появление зубцов *P* и *R*, совершенно независимо друг от друга (рис. 23).

Описанные эффекты антихолинэстеразных веществ обусловлены их периферическим действием, так как они могут быть



воспроизведены в опытах с перерезкой блуждающих нервов, а также на декапитированных животных, не говоря уже о том, что они наблюдаются на изолированном сердце и сердечно-легочном препарате. Проведенный Геймансом (Heumans, 1956) фармакологический анализ показал, что вызываемая антихолинэстеразными веществами брадикардия обусловлена их действием на М- и Н-холинореактивные системы сердца. Есть основания полагать, что в урежении сердечных сокращений принимает участие не только истинная, но и ложная холинэстераза.

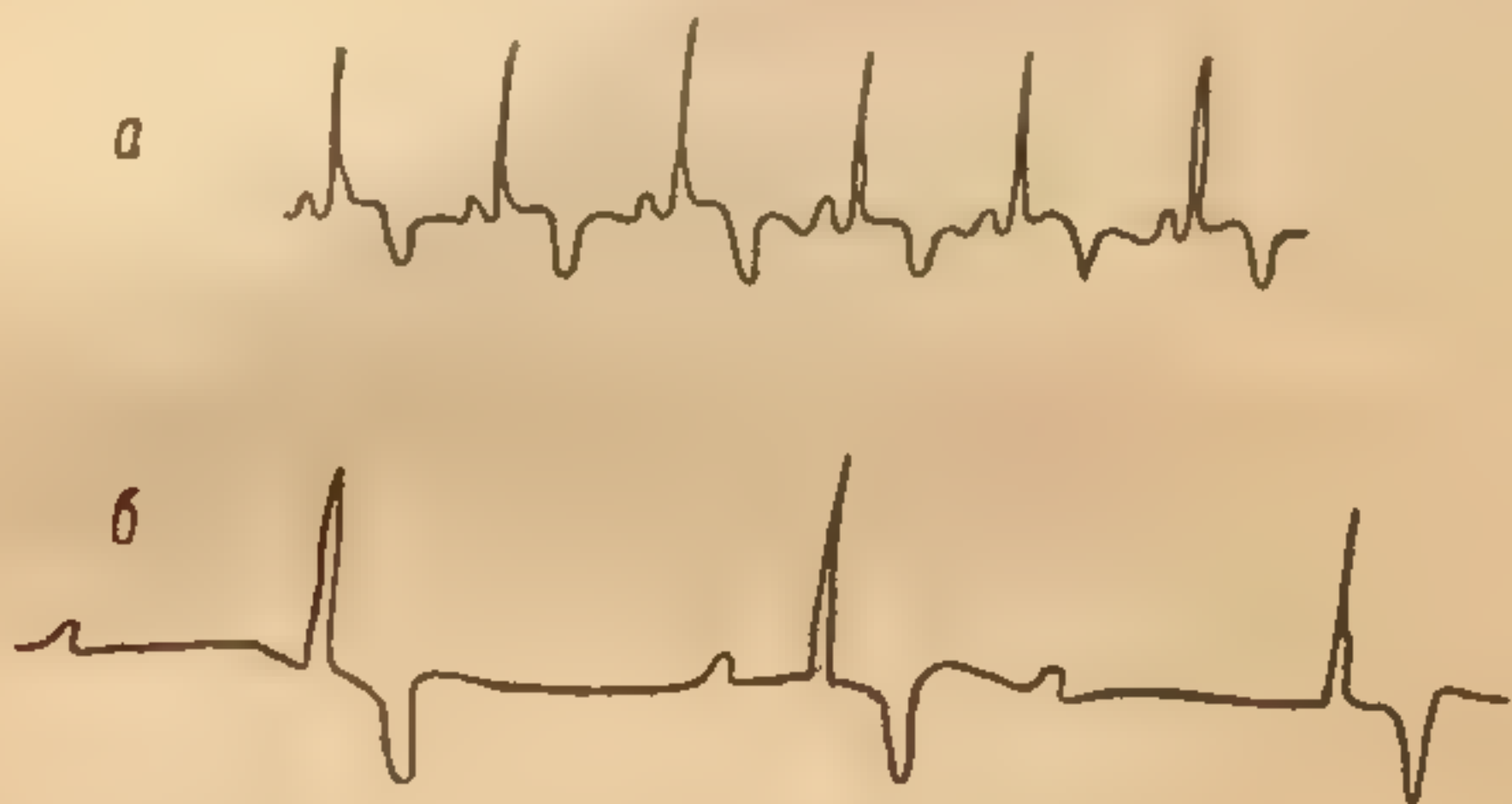


Рис. 23. Изменение ЭКГ под влиянием эзерина в опыте на сердечно-легочном препарате (Берн, 1961).

а — ЭКГ в норме; б — ЭКГ при полном атриовентрикулярном блоке, наступившем при добавлении в сосуд эзерина ( $27 \cdot 10^{-5}$  М).

Так, Берн и Валкер (Burn, Walker, 1954) нашли, что избирательный ингибитор ложной холинэстеразы Nu-683 [диметилкарбамат-(2-гидрокси-5-фенилбензил)-триметил-аммоний-бромид] в этом отношении был более эффективен, чем специфический ингибитор истинной холинэстеразы 248С [диметобромид 1,5-ди (п-Н-аллил-Н-метил-аминофенил)-пентан-3-он]. Эти данные согласуются с гипотезой Берна, согласно которой ритмическая активность сердца поддерживается путем местного синтеза ацетилхолина, ферментативный гидролиз которого осуществляется ложной холинэстеразой.

Механизм изменений под влиянием антихолинэстеразных веществ сердечного ритма в конечном итоге, вероятно, сводится к изменению мембранных потенциалов в сторону повышения их проницаемости для ионов калия (Trautwein, Dudel, 1958). Это подтверждается работами Голланда и сотр. (Holland et al., 1959), которые показали, что степень изменений метаболизма ацетилхолина и холинэстеразы в изолированном ушке сердца коррелирует с нарушениями ионной проницаемости.



## ДЕЙСТВИЕ НА ГАНГЛИИ

С тех пор как А. В. Кибяков (1933), применяя методику перфузии верхнего шейного симпатического ганглия кошки, впервые обнаружил в жидкости, оттекающей от ганглия во время раздражения преганглионарного ствола нерва, биологически активное вещество, а Фельдберг и Гаддум (Feldberg a. Gaddum, 1933) установили, что это вещество аналогично ацетилхолину, в области изучения влияния фармакологических веществ на ганглионарные синапсы накоплен огромный экспериментальный материал. Многие сведения по этому вопросу можно встретить в монографиях В. С. Шевелевой (1961), П. П. Денисенко (1959), Д. А. Харкевича (1962). В первой из упомянутых монографий хорошо изложены теоретические вопросы межнейронной передачи в ганглиях, две другие работы посвящены преимущественно ганглиоблокирующим средствам. В самое последнее время сведения о влиянии антихолинэстеразных веществ на ганглионарную передачу были суммированы в обширном обзоре Цаймис (Zaimis, 1963), к которому мы и отсылаем читателя для детального ознакомления с вопросом. В рамках настоящей книги мы считали возможным остановиться лишь на наиболее существенных сторонах ганглионарного действия антихолинэстеразных веществ.

Кэннон и Розенблют (Cannon a. Rosenbluth, 1937), Розенблют и Симоон (Rosenbluth a. Simeone, 1938) впервые описали действие эзерина и прозерина на верхний шейный симпатический ганглий. В свое время эти работы явились веским аргументом в пользу признания гуморальной роли ацетилхолина в межнейронной передаче.

Твердо установлено, что источником ацетилхолина являются окончания преганглионарных волокон, содержащие его запас, пополняемый холинацетилазной системой по мере расхода ацетилхолина в ответ на центробежный нервный импульс. Подсчитано, что на одиночный преганглионарный залп около одной ганглионарной клетки освобождается  $10^{-15}$  г ацетилхолина. Холинэстераза концентрируется на окончаниях преганглионарных волокон. Образующийся при гидролизе ацетилхолина холин используется для последующего непрерывного синтеза медиатора преганглионарными окончаниями. Доказано, что стимулирующее влияние ацетилхолина связано с его действием непосредственно в синапсах. Это действие весьма специфично и проявляется в присутствии антихолинэстеразных веществ, начиная с концентраций порядка  $10^{-8}$ . На рис. 24 дана схема, иллюстрирующая действие пороговых доз ацетилхолина до и после введения ДФФ.

Наиболее отчетливые результаты, характеризующие ганглионарное действие антихолинэстеразных веществ, получены пре-



имущественно в опытах на изолированных ганглиях. Общим для всех исследованных препаратов является то, что они в дозах, угнетающих истинную холинэстеразу, облегчают, а в больших дозах блокируют ганглионарную передачу. Указанная закономерность установлена для эзерина (Feldberg, Vartiani, 1934; Brown, Feldberg, 1936; Rosenbluth, Simeone, 1938), прозерина (Rosenbluth, Simeone, 1938), ДФФ (Marazzi, Jarvik, 1947; Holaday et al., 1954), ТЭПФ (Burgen et al., 1949), сульфометилата 3-(диизопропоксифосфинил-окси-N-метил пиридиния) (Burgen, Chimpan, 1952).

Эти данные согласуются с наблюдениями на целых животных. Известно, например, что у атропинизированных кошек от-

ветная реакция мигательной перепонки на преганглионарную стимуляцию усиливалась нивалином (Д. М. Пасков, 1958), ТЭПФ (Burgen et al., 1949), табуном (Holmstedt, 1951), соединениями 217МУ и 217АО (McIsaak, Koelle, 1959). Однако в опытах на целом животном ганглионарные эффекты антихолинэстеразных веществ были гораздо менее выражены по сравнению с их действием на нервно-мышечные синапсы. Ряд авторов при применении антихолинэстеразных веществ в ма-



лиях истинная холинэстераза находится только в пресинаптических окончаниях, в то время как в парасимпатических ганглиях она имеется и в постсинаптической мембране (рис. 25). Возможно, именно с этим различием связан тот факт, что антихолинэстеразные и многие другие холинергические вещества значительно сильнее действуют именно на парасимпатические ганглии.

Наиболее постоянным эффектом антихолинэстеразных веществ является усиление надпорогового раздражения. Кроме того, эти вещества способствуют суммации синаптических потенциалов в ганглии. Антихолинэстеразные вещества в действии на ганглии, так же как и на нервно-мышечные синапсы, являются антагонистами кураре (Chon, Elio, 1948). Этот антагонизм распространяется и на другие вещества, блокирующие ганглии. З. И. Веденеева (1951) наблюдала уменьшение эзеринем блокирующего действия тетраэтиламония. Аналогичные результаты в опытах с ДФФ получили Камийо и Келле (Kamijo, Koelle, 1952), показавшие, кроме того, что для осуществления этого антагонизма необходимо значительное (более чем на 50%) угнетение истинной холинэстеразы, при котором в контрольных опытах происходит усиление сокращений третьего века. Антагонизм между антихолинэстеразными веществами и некоторыми ганглиоблокирующими четвертичными основаниями наблюдал М. Л. Тараховский (1958). Как известно, атропин в больших дозах обладает ганглиоблокирующим действием. Голодай и др. (Holaday et al., 1954) установили, что ДФФ полностью предупреждает этот эффект атропина.

В опытах К. Г. Цирка (1957) эзерин и прозерин в дозах 0,05 и 0,1 мг/кг отчетливо ускоряли восстановление высоты сокращения третьего века, сниженной пентафеном и его четвертичными солями, а в больших дозах предупреждали этот эффект в течение 30—45 мин. Гистохимическим методом автору удалось выявить сильное торможение истинной холинэстеразы ганглия при действии вещества в эффективных дозах. Восстановление активности холинэстеразы в ганглии моноизонитрозом ацетоном сопровождается восстановлением функции (С. Н. Голиков, В. А. Печенкин, Ю. Г. Федорчук, 1958).

В пользу антихолинэстеразного действия ФОС на ганглии говорят опыты С. Н. Голикова, В. А. Печенкина, Ю. Г. Федор-

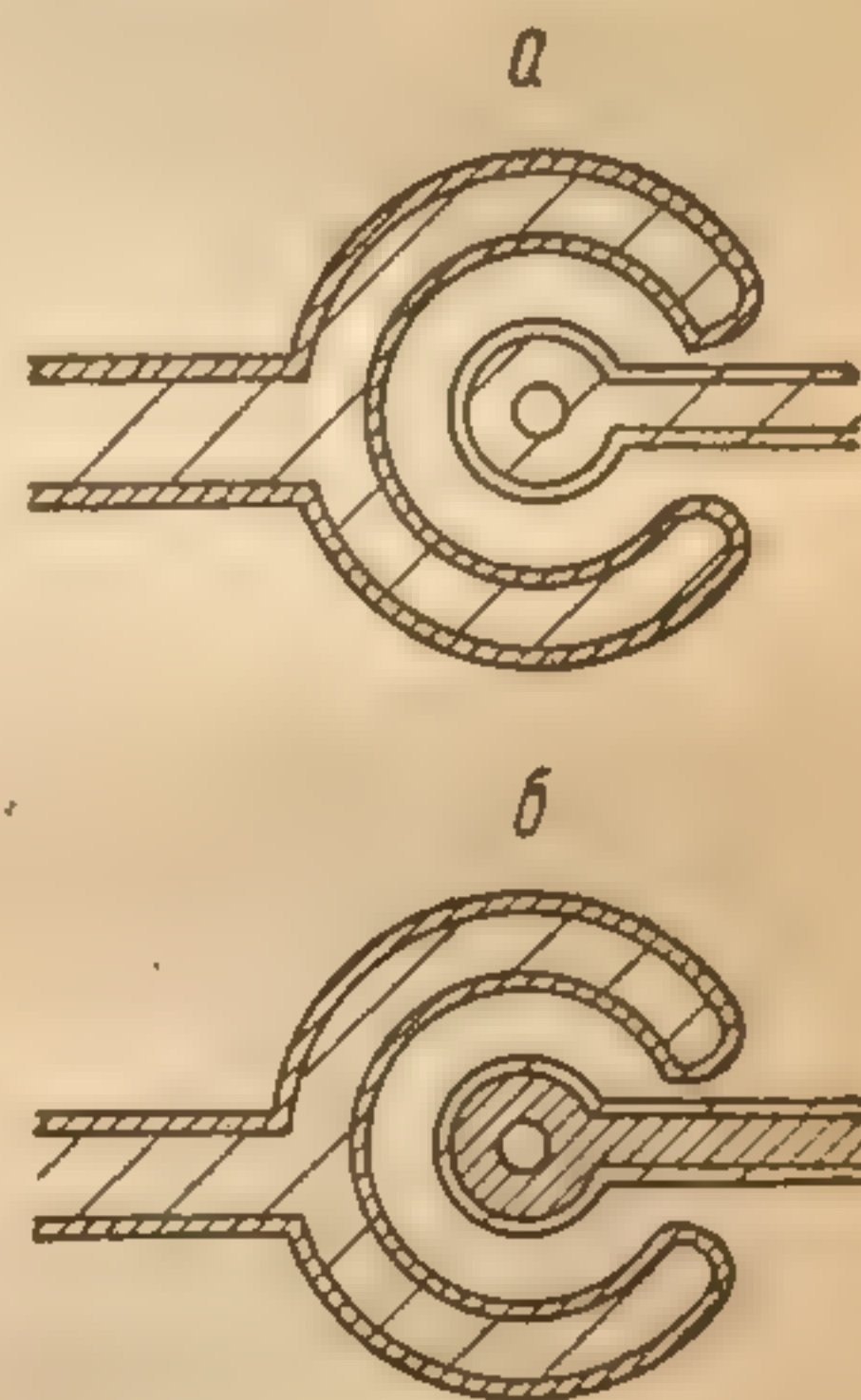


Рис. 25. Распределение наружной и внутренней холинэстеразы в звездчатом (а) и реснитчатом (б) ганглиях (Koelle a. Koelle, 1959).



чука (1958), в которых было показано, что фосфакол и ТЭПФ не действуют на денервированный ганглий, т. е. в условиях, когда клетки не синтезируют ацетилхолин.

Однако, как уже было отмечено, антихолинэстеразные вещества в больших дозах угнетают проведение возбуждения в вегетативных ганглиях. Поскольку последнее наблюдается при применении их в дозах, сильно превышающих количества, необходимые для полного угнетения холинэстеразы, есть достаточные основания считать, что этот эффект не связан с угнетением холинэстеразы, а зависит от непосредственного действия антихолинэстеразных веществ на Н-холинореактивные системы.

В оценке ганглионарного действия антихолинэстеразных веществ наиболее трудным, пожалуй, является выяснение участия этих эффектов в нарушении различных функций организма.

При изложении данных о влиянии антихолинэстеразных веществ на различные органы и системы мы приводили материалы о роли ганглионарных эффектов. Так, есть основания считать, что ганглионарные эффекты антихолинэстеразных веществ проявляются в отношении ганглионарных синапсов сердца, кишечника, бронхов (см. соответствующие разделы). Трудность более четкой дифференцировки этих эффектов от одновременно развивающегося действия на М-холинореактивные системы состоит в ограниченности методов, позволяющих изолированно воздействовать на парасимпатические ганглии (поскольку доступ к ним далеко не всегда осуществим). Значительно доступнее изучение влияния препаратов на симпатические узлы, однако именно они обладают меньшей чувствительностью к антихолинэстеражным веществам.

#### ВЛИЯНИЕ НА НЕРВНО-МЫШЕЧНЫЕ СИНАПСЫ

А. Ф. Самойлов (1924) впервые высказал мысль о гуморальной передаче нервного импульса с двигательного нерва на скелетную мышцу. В 1936 г. Дейл, Фельдберг и Фогт (Dale, Feldberg, Vogt) установили, что при раздражении моторных нервов на их окончаниях образуется ацетилхолин. С тех пор исследования гуморального механизма нервно-мышечной передачи продолжают с неослабевающей интенсивностью. Не имея возможности подробно освещать вопросы, связанные с действием на нервно-мышечные синапсы ацетилхолина и его миметиков (подробные сведения на этот счет можно встретить в обстоятельном обзоре Вернера и Куперман — Werner, Kuperman, 1963), попытаемся охарактеризовать особенности изменения функции нервно-мышечного синапса под влиянием антихолинэстеразных веществ.



Действие антихолинэстеразных веществ на скелетную мышцу проявляется по-разному, в зависимости от типа мышечных волокон и ритма раздражения. При медленном ритме раздражения антихолинэстеразные вещества, стабилизируя выделяющийся в синапсах ацетилхолин, облегчают передачу импульсов с нерва на мышцу независимо от вида мышцы. При высоких частотах раздражения эти вещества вызывают торможение передачи, связанное с чрезмерным накоплением ацетилхолина в области мионеврального синапса (пессимальная реакция). Последняя свойственна только нетоническим мышечным волокнам (например, икроножной мышце).

Как было показано А. Г. Гинецинским и Н. И. Михельсон (1937), А. Г. Гинецинским (1947) и А. К. Воскресенской (1959), эзерин и прозерин при действии на тонические волокна пессимальной реакции не вызывают, а приводят к резкому замедлению расслабления сокращения мышцы в ответ на кратковременное не прямое раздражение. Оба типа реакции мышцы на введение антихолинэстеразного вещества представлены на рис. 26 и 27.

Несмотря на то, что представления о механизме действия антихолинэстеразных веществ на нервно-мышечную передачу в принципиальном отношении за последнее десятилетие не претерпели существенных изменений, многие важные уточнения, касающиеся интимных сторон этого вопроса, появились совсем недавно. Это связано главным образом с введением микроэлектродной, микроморфологической, микроинъекционной (электрофоретической) и гистохимической техники.

Прежде чем перейти к рассмотрению непосредственно интересующих нас материалов, остановимся кратко на современных морфофизиологических данных, без которых невозможно понять сложный процесс нервно-мышечной передачи.

Нервно-мышечное соединение, в котором осуществляется гуморальная передача нервного импульса, состоит из синаптической бляшки, субсинаптической мембраны и синаптической щели между ними. В синаптической бляшке находятся синаптические пузырьки, содержащие ацетилхолин. Общие представления о строении синапсов были рассмотрены выше (см. рис. 1, стр. 6).

Основное отличие нейро-мышечного синапса от других синапсов заключается в складывании субсинаптической мембраны, которая образует субсинаптические складки.

Процесс передачи складывается из цепи строго последовательных превращений. В ответ на нервный импульс из лопнувших пузырьков в синаптическую щель синхронно выбрасывается минимальное количество «квантов» ацетилхолина (в каждом кванте несколько тысяч молекул ацетилхолина), после чего происходит взаимодействие медиатора с холинорецептором кон-



цевой пластинки<sup>1</sup>. Это приводит к резкому увеличению проницаемости (пористости) концевой пластинки, так что становится возможным свободное прохождение ионов натрия в мембрану и выход ионов калия из нее. В связи с этим наступает деполяризация постсинаптической мембраны и возникают потенциалы концевой пластинки. Показано также, что при



Рис. 26. Появление остаточной контрактуры после сокращения изолированной прямой мышцы живота лягушки, вызванного прямым электрическим раздражением в результате действия армина (Е. К. Рожкова, Р. С. Рыболовлев и др., 1962).

Амплитуда импульсов — 1 в;  
стрелка — введение армина ( $1 \cdot 10^{-7}$ ).

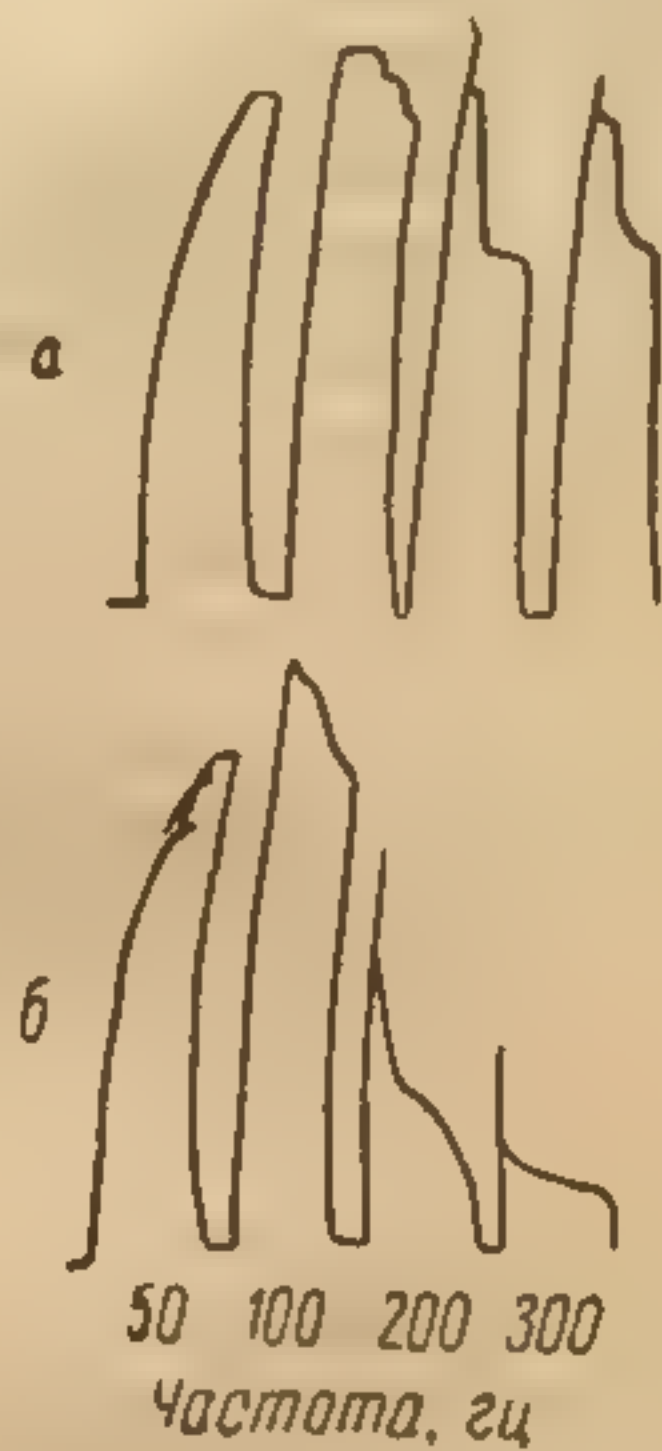


Рис. 27. Углубление тетанических реакций икроножной мышцы кошки при разных частотах раздражения периферического отрезка седалищного нерва (Е. К. Рожкова, Р. С. Рыболовлев и др., 1962).

Амплитуда импульсов — 1 в.  
а — механограммы сокращений мышцы в норме; б — механограммы сокращений через 10 мин после внутривенного введения препарата М-136  $[\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{P}-(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-\text{C}_2\text{H}_5]$  в дозе 0,15 мг/кг.

каждом импульсе поглощается  $50 \cdot 10^{-15}$  г экв ионов натрия и столько же теряется ионов калия (Экклс, 1959). Генерализация миниатюрных потенциалов обеспечивает распространение

<sup>1</sup> Минимальное число молекул ацетилхолина, необходимое для осуществления взаимодействия медиатора с рецептором, составляет  $3 \cdot 10^{-6}$ . Поскольку один рецептор может быть стимулирован одной молекулой ацетилхолина, количество рецепторов на одной концевой пластинке должно соответствовать приблизительно этому порядку величин или быть несколько большим с учетом складчатого строения субсинаптической мембраны. Этому числу примерно соответствует число молекул кураре, связываемых одной концевой пластинкой.



потенциалов на соседние концевые мембраны, вследствие чего возникает более выраженный потенциал действия, вызывающий сокращение мышцы.

Синхронное освобождение большого количества квантов ацетилхолина, как уже указывалось, вызывает появление потенциала концевой пластинки; но даже когда нервные импульсы не приходят, происходит спонтанное освобождение небольшого количества квантов ацетилхолина, которые вызывают минутное изменение потенциалов (миниатюрные потенциалы концевой пластинки), величины которых ниже пороговых.

Известно, что проницаемость клеточной мембраны для ионов неодинакова: концентрация  $\text{Na}$  всегда выше снаружи, чем внутри покоящейся клетки, ионов  $\text{K}$  — наоборот. Ионы калия легко проникают через мембрану внутрь клетки, но выход из клетки в окружающую жидкость для них затруднен; ионы натрия, напротив, легко выводятся из клетки, но плохо проникают в нее. Различие между находящимися в равновесии концентрациями ионов внутри и вне клетки ведет к поляризации мембраны: наружная сторона мембраны заряжена положительно по отношению к ее внутренней среде (разность потенциалов порядка  $10 \text{ мв}$ ). Если с помощью электрического тока изменить заряд мембраны, т. е. сделать внутренней ее поверхность, как и наружную, положительной, то ее проницаемость полностью изменится. Ионы натрия, вместо того чтобы преимущественно выходить из клетки, будут интенсивно проникать в нее. Повышение концентрации внутри клетки приведет к тому, что участки мембраны, смежные с точкой действия потенциала, станут с внутренней стороны положительно поляризованными, что в свою очередь приведет к изменению проницаемости мембраны. Этот процесс, подобно цепной реакции, раз начавшись, спонтанно продолжается и распространяется во все стороны, пока не восстановится первоначальное ионное состояние. Во время возбуждения существует разность потенциалов между поверхностью и содержимым клетки, которая сменяется возвращением к положительному потенциалу покоя.

Резюмируя изложенное, следует сказать, что мембрана концевой мышечной пластинки поляризована, т. е. между наружным и внутренним слоями мембраны существует разность потенциалов. При раздражении нерва (импульсом) выделяющийся в нервных окончаниях ацетилхолин вызывает кратковременную деполяризацию концевой пластинки, которая в конечном счете приводит к появлению мышечной реакции.

Действие антихолинэстеразных веществ на концевую пластинку может быть охарактеризовано следующими тремя видами эффектов.

1. Антихолинэстеразные вещества вызывают фибрилляцию мышц, находящихся в покое. Полагают, что этот эффект связан



# Схематическое изображение одного элементарного цикла нервно-мышечной передачи

Последовательность основных превращений АХ

Эфферентный нервный импульс

Выброс множества квантов ацетилхолина

Контакт с концевой пластинкой (соединение с холинорецептором)

Удаление АХ из рецепторов (в течение нескольких миллисекунд с помощью ферментативного гидролиза и диффузии)

Последовательность основных процессов в концевой пластинке

Увеличение проницаемости концевой пластинки для всех ионов

Деполаризация и возникновение потенциалов концевой пластинки

Генерализация миниатюрных потенциалов и распространение их на соседние концевые мембраны (потенциал действия)

Мышечное сокращение

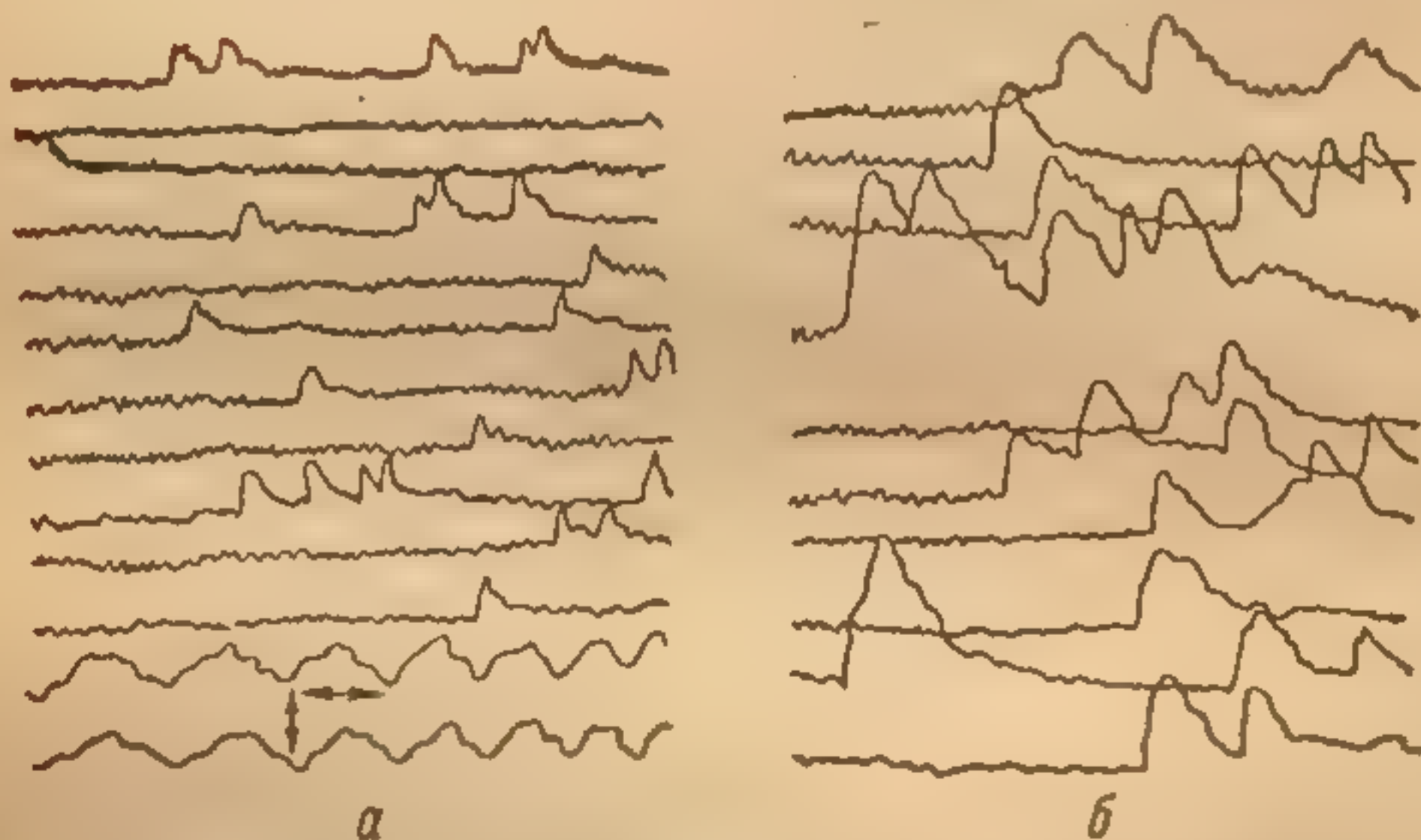


Рис. 28. Влияние эзерина на миниатюрные потенциалы концевой пластинки мышцы лягушки (Fatt и Katz, 1952).

а — в норме; б — после добавления  $10^{-6}$  М прозерина.

с действием антихолинэстеразных веществ на миниатюрные потенциалы концевой пластинки (рис. 28). Увеличение амплитуды и частоты миниатюрных потенциалов может привести к появлению распространенных действующих потенциалов, которые в

свою  
(фибриллярная)  
фасцикуляция  
нии по  
2. А  
реакции  
Каждо  
в каждо  
Этот ф  
ровани  
3. Е  
антихо  
концев  
Мы  
синапса  
амплит  
цевой  
таничес  
пульс.  
могут  
блок).  
ляриза  
ацетилх  
потенци  
ся депол  
блока  
веществе  
нием ст  
Однако  
дования  
званный  
мембра  
блок пр  
Отск  
антихол  
рый сл  
дующег  
Наи  
мышечн  
ствами,  
эстераз  
ных для  
1. Н  
блок, в  
Нервно  
вается  
ходит от



свою очередь вызывают отдельные мышечные подергивания (фибрилляции), переходящие в сокращения групп волокон — фасцикуляции (Liley, 1956). Здесь речь идет о пролонгировании потенциала концевой пластинки.

2. Антихолинэстеразные вещества значительно увеличивают реакцию, вызванную непрямой стимуляцией низкой частоты. Каждое раздражение дает «вспышку» потенциалов действия в каждом волокне, что приводит к кратковременному тетанусу. Этот феномен, так же как и фасцикуляции, зависит от потенцирования миниатюрных потенциалов концевой пластинки.

3. В ответ на тетанические раздражения высокой частоты антихолинэстеразные вещества снижают величину потенциалов концевой пластинки (пессимальная реакция).

Мы уже говорили, что когда нервный импульс достигает синапса с угнетенной холинэстеразой, происходит увеличение амплитуды и удлинение продолжительности потенциалов концевой пластинки. Этому феномену соответствует появление тетанического подергивания в ответ на единичный нервный импульс. Но, что особенно важно, повторные раздражения нерва могут вызвать пессимальное торможение (нервно-мышечный блок). По своему типу этот блок должен быть отнесен к деполяризационному, так как он возникает вследствие накопления ацетилхолина в синапсе. И действительно, прозеринный блок потенцируется ацетилхолином и декаметонием, которые являются деполяризующими агентами, и устраняется конкурентными блокаторами типа кураре. Вызываемый антихолинэстеразными веществами нервно-мышечный блок обязан своим происхождением стойкой деполяризации мембраны концевой пластинки. Однако, как показали проведенные на клеточном уровне исследования Тислефа (Thesleff, 1959), период деполяризации, вызванный деполяризующим агентом, является коротким, причем мембрана быстро и полностью реполяризуется, в то время как блок продолжается еще довольно значительное время.

Отсюда следует, что нервно-мышечный блок, вызываемый антихолинэстеразными веществами, является смешанным, который складывается из начального периода деполяризации и последующего рефрактерного периода, сходного с эффектом кураре.

Наиболее существенным для понимания механизма нервно-мышечного блока, вызываемого антихолинэстеразными веществами, является установление его связи с угнетением холинэстеразы. Остановимся прежде всего на некоторых фактах, важных для понимания этой связи.

1. На изолированных мышечных препаратах установлено, что блок, вызванный эзерином, легко устраняется отмыванием. Нервно-мышечный блок, вызванный фосфаколом, восстанавливается лишь при повторном отмывании — в этом случае происходит отмывание избытка ацетилхолина, однако возобновление



частых раздражений нерва немедленно снова вызывает блок (Е. К. Рожкова, Р. С. Рыболовлев и др., 1962). После других агентов восстановление происходит еще менее быстро (ТЭПФ) или вовсе не происходит (ДФФ). Этот факт в определенной мере соответствует обратимому и необратимому характеру угнетения холинэстеразы указанными агентами.

2. Барнес и Дафф (Barnes, Duff, 1953) в опытах на изолированных мышечных препаратах и целом животном установили зависимость между наступлением тетануса и критическим уровнем угнетения активности холинэстеразы мышцы: способность поддерживать тетанус исчезала при снижении уровня активности холинэстеразы до 10% исходной активности.

3. Согласно данным Экклса и Макфарлана (Eccles, McFarlan, 1949), исследовавших действие ДФФ и шести не содержащих фосфора антихолинэстеразных веществ на потенциалы концевой мышечной пластинки, существует связь между угнетением холинэстеразы и эффектом. Реактиватор холинэстеразы диоксиминоацетон устраняет нервно-мышечный блок, вызванный заринном (Holmes, Robins, 1955). Аналогичные результаты получены с моноизонитрозоацетоном при блоке, вызванном фосфаколом и ТЭПФ (С. Н. Голиков и др., 1958). Параллельные наблюдения за функцией нервно-мышечного синапса и уровнем активности холинэстеразы в нем показали, что подавление ФОС (фосфаколом и фосарбином) функции синапса сочетаются с инактивацией холинэстеразы в концевых моторных пластинках (И. И. Барышников и В. В. Соколовский, 1957; В. В. Соколовский, Н. В. Королев, 1959). Отмечена корреляция между степенью восстановления функции и повышением активности холинэстеразы под влиянием реактиваторов.

4. Известно, что тетанус в мышце возникает в ответ на стимуляцию определенной частоты и что чем выше частота стимуляции, тем слабее тетанус. Антихолинэстеразные вещества снижают способность мышцы к тетанусу, причем между уровнем активности холинэстеразы в мышце и частотой стимуляции установлена обратная зависимость. При снижении активности фермента до 15, 10 и 8% от нормы частота стимуляции составляла соответственно 120, 60 и 30 стимулов в секунду (Nathan, Aprison, 1955).

5. Существует связь между временем наступления и продолжительностью деполяризации и уровнем ацетилхолина в крови (рис. 29).

6. На денервированной мышце антихолинэстеразные вещества не эффективны.

Несмотря на то, что антихолинэстеражным действием можно довольно удовлетворительно объяснить вызываемые антихолинэстеразными веществами нервно-мышечные эффекты, имеется

значитель  
низм. Реч  
холинэсте  
рода пол  
веществ  
более час  
рате.

Одна  
показано,  
разные ве  
вызвать с  
цы в ус  
предварит

тения  
(Ю. Г.  
Ricker,  
Miquel,  
Jampolsky

Другие  
о том,  
эстеразны  
тенцирую  
только эф  
зующихся  
зой, но и  
ергически  
которые не  
этим ферм  
мер, холи  
на, эдро  
гих четвер  
боловлев,  
др., 1952).

Ингиби  
ных аммон  
нейро-мыш  
было ожи  
рующего д

Все эт  
эстеразно  
но непосре

Для пр  
значение  
проявляетс  
вызывают  
концевую



значительная группа фактов, не укладывающаяся в этот механизм. Речь идет о непосредственном, не связанном с угнетением холинэстеразы действием на холинорецепторы. Факты подобного рода получены при исследовании действия антихолинэстеразных веществ на различные органы и системы, но они, пожалуй, наиболее часто повторялись в опытах на нервно-мышечном аппарате.

Одна группа фактов объединяет наблюдения, в которых было показано, что эзерин, прозерин, ДФФ и другие антихолинэстеразные вещества способны вызвать сокращение мышцы в условиях полного предварительного угнетения холинэстеразы (Ю. Г. Федорчук, 1957; Ricker, Wescoe, 1946; Miquel, 1946; Randall, Jampolsky, 1953).

Другие факты говорят о том, что антихолинэстеразные вещества потенцируют действие не только эфиров, гидролизующихся холинэстеразой, но и таких холинэргических веществ, которые не гидролизуются этим ферментом, — например, холина, карбохолина, эдрофония и других четвертичных аминов (С. Н. Голиков и др., 1958; Р. С. Рыболовлев, 1948; Cohen, Poshumus, 1958; Hutter, 1952; Jacob и др., 1952).

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы из группы бис-четвертичных аммониевых соединений являются гораздо более мощными нейро-мышечными блокирующими агентами, чем этого можно было ожидать, исходя из их сравнительно не сильного ингибирующего действия.

Все эти факты позволяют считать, что помимо антихолинэстеразного действия рассматриваемым препаратам свойственно непосредственное влияние на концевую пластинку.

Для проявления того или другого вида действия решающее значение имеет доза вещества. Антихолинэстеразное действие проявляется в случае применения небольших доз. Большие дозы вызывают эффекты вследствие непосредственного действия на концевую пластинку.

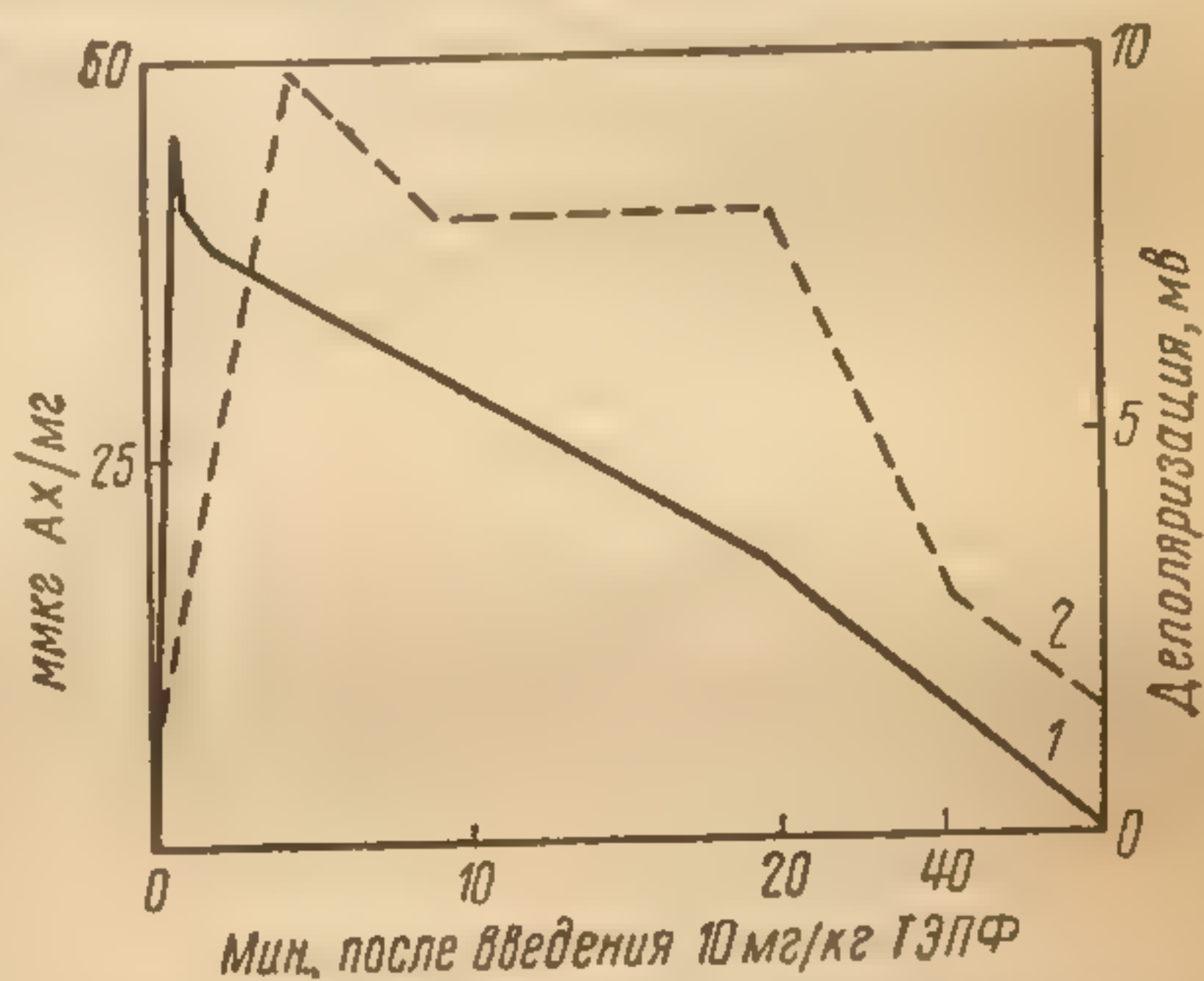


Рис. 29. Зависимость между деполяризацией концевой пластинки (1) *m. gracilis* кошки и уровнем ацетилхолина (2) при отравлении ТЭПФ в дозе 10 мг/кг внутривенно (Douglas a. Paton, 1954).



Иными словами, в зависимости от концентрации антихолинэстеразные вещества могут проявлять по отношению к скелетной мышце холиносенсибилизирующее, холинолитическое и холиномиметическое действие (В. М. Карасик, 1946; М. Я. Михельсон, 1948).

При повторных воздействиях или длительном применении одной дозы антихолинэстеразного вещества возможно снижение чувствительности мышцы (адаптация). В этом отношении показательны тонкие опыты Аксельсона и Тислефа (Axelsson, Thesleff, 1958). Авторы вставляли раздвоенную микропипетку непосредственно в мионевральные щели и при помощи микроэлектродов регистрировали потенциалы нижележащих волокон. Из одного конца микропипетки ничтожно малые дозы ацетилхолина подавались небольшими порциями через каждую секунду, при этом каждый раз регистрировались (этим имитировалось выделение АХ в ответ на импульс) вызываемые внутриклеточно потенциалы концевой пластинки. В то же время из второго конца подавалась условная доза ацетилхолина, но уже не порциями, а постоянно, что имитировало накопление ацетилхолина в результате действия ингибитора холинэстеразы. Во время этой постоянной инфузии реакция на отдельные инъекции становилась меньше. Тем не менее, уже через несколько секунд наступала адаптация, и потенциалы полностью восстанавливались.

Экспериментальные данные о влиянии антихолинэстеразных веществ на нервно-мышечную передачу суммированы в табл. 22.

### Антикурарное действие

Влияние эзерина, а затем и других антихолинэстеразных веществ на нервно-мышечный блок, вызванный кураре, стало изучаться после того, как в 1936 г. был установлен антагонизм между ацетилхолином и кураре в действии на мышцу (Brisco). К настоящему времени в литературе накопилось большое количество данных об антикурарной активности многих ингибиторов холинэстеразы.

Для того, чтобы рассмотреть антикурарные эффекты и уяснить их механизм, необходимо кратко охарактеризовать действие на концевую мышечную пластинку ацетилхолина, кураре и декаметония, являющегося типичным деполяризующим агентом.

Как известно, ацетилхолин вызывает кратковременную деполяризацию концевой пластинки, необходимую для возникновения мышечной реакции. Декаметоний также вызывает деполяризацию, но гораздо более продолжительную. На этом фоне импульсы, поступающие из центральной нервной системы, не могут вызывать потенциалы концевой пластинки и возбуждение мышцы — последняя становится невозбудимой и перестает сокра-



Таблица 22

Действие антихолинэстеразных веществ на нервно-мышечную передачу у разных видов животных (по литературным данным)

Мышца	Соединение	Доза (мг/кг)	Эффект	Автор
Кошка				
Диафрагмальная	ТЭПФ	0,45	Угнетение и подавление сокращений	Douglas, Matthews, 1952
Передняя берцовая	»	1,0	Утрата способности сохранять тетанус. ПАМ-2 антагонизирует с эффектом ТЭПФ	Fredriksson, 1957
Четырехглавая	»	0,1	Тетаническое сокращение в ответ на единственный стимул	Brown et al., 1957
»	»	0,2	Угнетение и подавление сокращений	Cheneis et al., 1949
»	»	40	d-Тубокурарин снимает как возбуждающее, так и парализующее действие	Douglas, Patton, 1954
Икроножная	ДФФ	15,0	Утрата способности сохранять тетанус	McNamara et al., 1954
Диафрагмальная	Зарин	0,2	Угнетение и подавление сокращений. Утрата способности сохранять тетанус	Brown et al., 1957
Икроножная	»	0,2	Синергизм с сукцинилхолином и антагонизм с d-тубокурарином и ПАМ-2	Kunkel et al., 1956
Передняя берцовая	»	0,3	Утрата способности сохранять тетанус. Антагонизм с ПАМ-2	Holmes, Robins, 1955
Икроножная	Табун	0,8	Угнетение и подавление сокращений. Антагонизм с ПАМ-2	Brown et al., 1957
Передняя берцовая	»	0,01	Тетаническое сокращение в ответ на единичные стимулы. Синергизм с сукцинилхолином и антагонизм с d-тубокурарином	Holmstedt, 1951
»	»	0,02	Угнетение и подавление сокращений, утрата способности сохранять тетанус. В остальном — то же, что и в дозе 0,01 мг/кг	Он же
»	Метилфторфосфорилин	0,02	Тетаническое сокращение в ответ на единственный стимул. Антагонизм с d-тубокурарином и синергизм с сукцинилхолином	Fredriksson, 1957, 1958



Мышцы	Соединение	Доза (мг/кг)	Эффект	Автор
Передняя берцовая	Метил-фтор-фосфорилхолин	0,03	Угнетение и подавление сокращений. Остальное то же, что и в дозе 0,02.	Fredriksson, 1957, 1958
Шейная	ТЭПФ	Разные	Кролик Синергизм с сукцинилхолином и антагонизм с d-тубокурарином	Low, Tam-melin, 1951
»	ДФФ	Разные	Антагонизм с d-тубокурарином	Holmes a. Robins, 1955
Диафрагмальная	»	1—2	Утрата способности сохранять тетанус	Lundholm, 1949
Икроножная	»	1—2	Тетанические сокращения в ответ на единичные стимулы, утрата способности сохранять тетанус	Он же
Передняя большеберцовая	»	1—2	То же, что и на икроножной мышце	» »
Диафрагмальная	Зарин	0,03	Тетаническое сокращение в ответ на единичные стимулы, утрата способности сохранять тетанус	Wright, 1954, DeCandol et al., 1953
Икроножная	Паратион	7	Утрата способности сохранять тетанус. Антагонизм с ПАМ-2	Fournel, 1957
»	Эндотион	12	То же, что и с паратионом	Он же
Крыса				
Диафрагмальная	217МУ	0,05	Тетаническое сокращение в ответ на единичный стимул	Schaumann, 1958
	»	0,1	Угнетение с подавлением сокращений	Он же
	217АО	0,5	Тетаническое сокращение в ответ на единичный стимул или подавление сокращений	» »
»	Фосфат Зарин	0,03	Утрата способности сохранять тетанус	Sacal et al., 1958
		0,05	Тетаническое сокращение в ответ на единичный стимул, антагонизм с d-тубокурарином	Heymans et al., 1956
Жевательная	Зарин	0,03	Угнетение и подавление сокращений, антагонизм с d-тубокурарином	Он же

щаться. d-Т...  
пластинки, н...  
тор), в резу...  
зацию, необх...  
цы полностью...  
ление ацетил...  
Если в случа...  
пластинки яв...  
курарина это...  
Для осуще...  
мальные коли...  
ласть нервно...  
холинэстераз...  
так же как и...  
ляризации и...  
при комбинир...  
декаметония...  
потенциал кон...  
вать деполяри...  
Антихолин...  
ляризирующих...  
ным антикура...  
только по отн...  
добным вещес...  
1959; М. Д. М...  
(М. Д. Машко...  
примера прив...  
зеринном кура...  
Антихолин...  
цу деполяризу...  
ния, о чем мн...  
действия. В о...  
линэстеразных...  
торам может...  
сится к таким...  
зуются холин...  
чрезвычайно...  
дихолиновые...  
дитилин (диа...  
действия дити...  
частности, в...  
Н. Ф. Мистак...  
niste, Dyrberg...  
ного вещества...  
уменьшить не...  
последнего с 9



щаться. d-Тубокурарин не вызывает деполяризации концевой пластинки, но блокирует место действия ацетилхолина (рецептор), в результате чего последний перестает вызывать деполяризацию, необходимую для возникновения возбуждения, хотя мышцы полностью сохраняют способность к возбуждению, а выделение ацетилхолина из нервных окончаний не прекращается. Если в случае действия декаметония потенциал двигательной пластинки является избыточным, то после воздействия d-тубокурарина этот потенциал слишком мал.

Для осуществления нормальной передачи необходимы оптимальные количества ацетилхолина. Накопление последнего в области нервно-мышечного синапса в результате воздействия антихолинэстеразных веществ или по другим причинам приведет, так же как и в случае действия декаметония, к длительной деполяризации и неизбежному блоку. В то же время очевидно, что при комбинированном применении действие антихолинэстераз и декаметония будет взаимно усиливаться. D-тубокурарин, снижая потенциал концевой пластинки, напротив, может противодействовать деполяризации, вызываемой декаметонием.

Антихолинэстеразные вещества, действующие по типу деполяризующих нервно-мышечных блокаторов, обладают выраженным антикурарным действием. Это действие установлено не только по отношению к самому кураре, но и к другим курареподобным веществам — например, диплацину (И. В. Комиссаров, 1959; М. Д. Машковский и А. И. Брискин, 1952) и квалидилу (М. Д. Машковский и Ф. Садритдинов). На рис. 30 в качестве примера приведена кимограмма, иллюстрирующая снятие прозеринном курарного действия квалидила.

Антихолинэстеразные вещества усиливают действие на мышцу деполяризующих веществ. Это касается не только декаметония, о чем мы уже говорили, но и других веществ подобного действия. В отдельных случаях потенцирующий эффект антихолинэстеразных веществ по отношению к некоторым деполяризаторам может быть объяснен и другим механизмом. Это относится к таким деполяризующим агентам, которые сами гидролизуются холинэстеразой, в связи с чем их эффект в организме чрезвычайно непродолжителен. К таким веществам относятся дихолиновые эфиры амида-дикарбоновых кислот — например, дитилин (диацетилхолин, сукцинилхолин). Пролонгирование действия дитилина может иметь и практическое значение — в частности, в хирургической практике (С. М. Зольников, Н. Ф. Мистаконуло, 1960). По Бенвенисту и Дирбергу (Benveniste, Dyrberg, 1962), совместное применение антихолинэстеразного вещества тетрагидроаминоакридина с дитилином позволило уменьшить необходимую для расслабления мускулатуры дозу последнего с 9,68 мг/мин до 2,35 мг/мин.



Антикурарное действие эзерина и других антихолинэстеразных веществ легко объяснить угнетением холинэстеразы. Однако до тех пор, пока в 1949 г. Блашко и др. (Blaschko et al.) не опубликовали свои данные о существовании четкой зависимости между этими эффектами, эта точка зрения оспаривалась. Авторы изучали два показателя:  $pI_{50}$  (логарифм обратной величины концентрации, ингибирующей холинэстеразу на 50%) и  $pD-20$  (логарифм обратной величины той концентрации ингибитора, которая при совместном применении с тубокурарином соответствовала торможению сокращений на 20%). Статистический

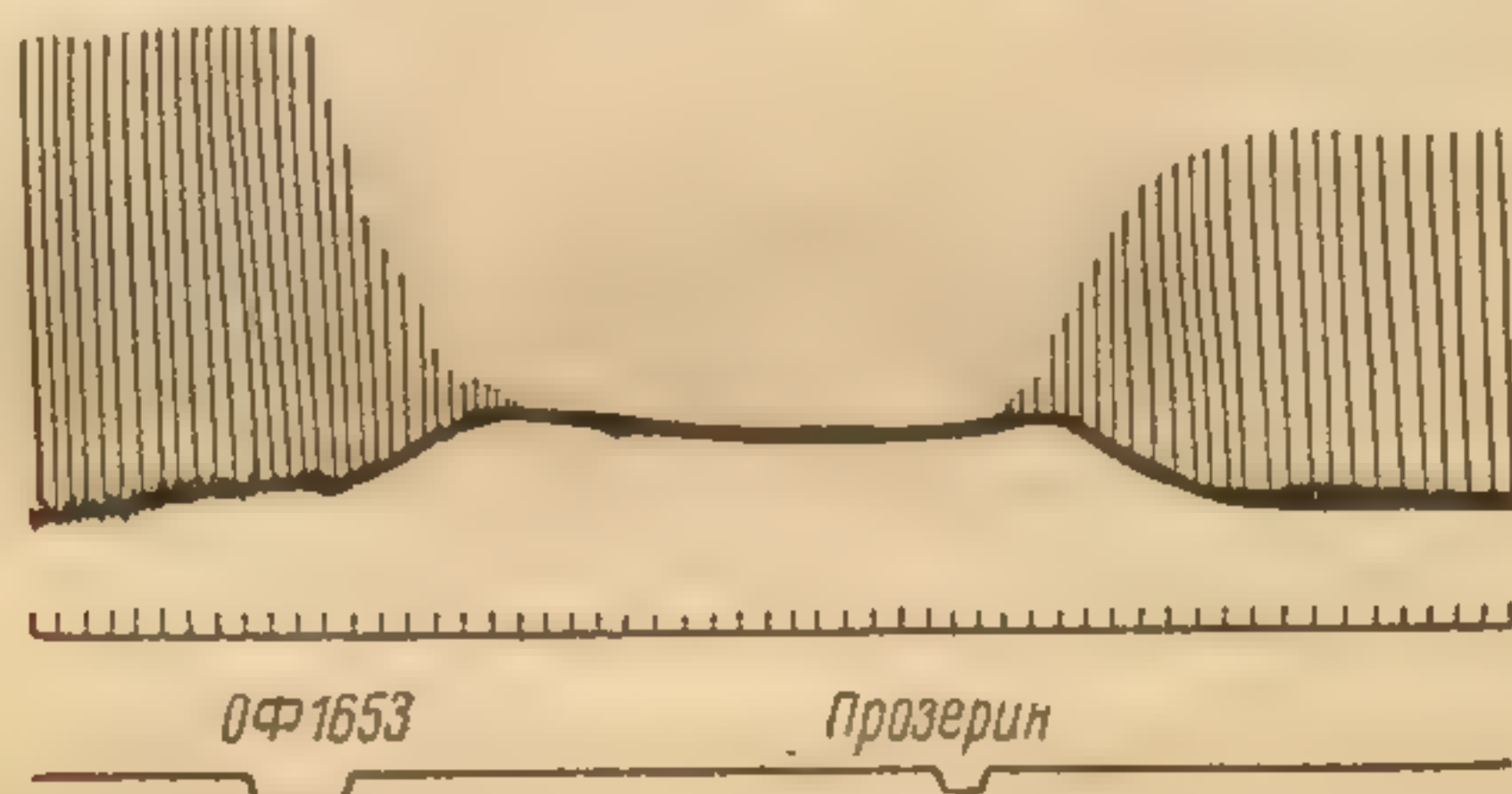


Рис. 30. Антагонизм прозерина с квалидилем (М. Д. Машковский, Ф. Садритдинов, 1962).

Уретановый наркоз. Сверху вниз: сокращение икроножной мышцы, отметка времени (5 сек), отметка введения квалидила (ОФ 1653 0,3 мг/кг) и прозерина (0,15 мг/кг).

анализ показал, что между двумя этими показателями для истинной холинэстеразы существует достоверная корреляция; следовательно, выраженность антикурарного действия прямым образом зависит от способности угнетать холинэстеразу.

Смис, Кохен и др. (Smith, Cohen et al., 1952) установили достоверную корреляцию между антихолинэстеразной и антикурарной активностью (на прямой мышце живота лягушки) тензилона (эдропония) и его аналогов, а также эзерина, прозерина и ТЭПФ. Близкие результаты получил Хоббигер (Hobbiger, 1952) с эерином и тензилоном и серией метониевых солей м-диметиламинофенолбензоата, -ацетата и -м-толуата. В случае предварительного угнетения холинэстеразы антикурарное действие устранялось.

Как показали опыты Д. С. Паскова (1958), нивалин снимает блокаду передачи нервных импульсов с окончаний двигательных нервов на поперечнополосатые мышцы, вызванную d-тубокурарином, пиролаксоном, парамионом и диплацином, т. е. веществами конкурентного типа действия (этот антагонизм является двусторонним). На основании изучения эффективности и продолжительности действия нивалина автор пришел к выводу о его практической ценности как антикурарного средства.



## Мышечные параличи

Некоторые фосфорорганические соединения, к которым прежде всего принадлежит триортокрезилфосфат (ТОКФ), вызывают у людей развитие тяжелых вялых параличей, связанных с демиелинизацией периферических нервов, а возможно, и белого вещества спинного мозга (нейротоксическое действие ФОС). Подобные состояния были воспроизведены на обезьянах, собаках, кроликах и цыплятах (сводку работ см. у Дэвиса — Davies, 1963). Крысы оказались в этом отношении малочувствительными. При пероральном введении яда ТОКФ вызывал паралич только у кроликов и цыплят.

Из других антихолинэстеразных соединений способностью вызывать демиелинизацию обладают: ДФФ, мипафокс, диэтилфторфосфат (Barnes, Denz, 1953) и три-(этилфенил)-фосфат (Silver, 1960). Интересно, что мета- и параизомеры трикрезилфосфата не вызывают демиелинизации (Aldridge, 1954). Согласно данным Остина и Дэвиса (Austin a. Davies, 1954), зарин, табун, зоман и этилзарин также не вызывают демиелинизации. Это же относится и к таким соединениям, как диметол, диазинон, ЭФН, малатион и октаметил (Darham et al., 1956).

Паралитическое действие ТОКФ является типичным примером неантихолинэстеразного действия фосфорорганических соединений, поскольку ТОКФ не угнетает истинную холинэстеразу. Кроме того, известно, что наиболее мощные ингибиторы холинэстеразы не вызывают демиелинизации. Попытки объяснить демиелинизацию действием ТОКФ на ложную холинэстеразу также не привели к успеху, так как оказалось, что другие избирательные ингибиторы ложной холинэстеразы (например, октаметил) демиелинизации не вызывают (Davison, 1954). Хайну и др. (Hine et al., 1956) не удалось установить сколько-нибудь удовлетворительной зависимости между угнетающим действием большого числа ароматических соединений на холинэстеразы (ложную и истинную) и их способностью вызывать параличи.

Несмотря на то, что не было найдено никакой определенной зависимости, вряд ли можно сбрасывать со счетов тот факт, что все вещества, вызывающие параличи, являются ингибиторами ложной холинэстеразы. Тем более, что именно ложная холинэстераза в нервной системе связана с миелинизированными проводящими путями белого вещества (Burgen, Chipman, 1951; Ord, Thompson, 1952) и обнаруживается в шванновских клетках миелиновых волокон (Koelle, 1951).

Оставляя вопрос о роли угнетения ложной холинэстеразы в возникновении параличей открытым, сошлемся еще на данные Блоха и Хоттингера (Bloch, Hottinger, 1953), которые обнаружили, что витамином Е можно предупредить развитие па-



ралича, вызванного у кроликов ТОКФ. Действительно, заболевание Е-авитаминозом снижает чувствительность животных к паралитическому действию ТОКФ (Draher, 1952), но каким образом это можно увязать с действием ТОКФ, пока остается не ясным. Заслуживает также внимания предположение Касида и др. (Casida и др., 1961), согласно которому демиелинизирующее действие ТОКФ связано с угнетением эстераз, гидролизующих о-карбоновые эфиры тиамин и кортизона, в результате чего уменьшается содержание в организме тиамин и кортизона, которые существенно необходимы для образования миелиновых оболочек.

#### ВЛИЯНИЕ НА НЕЙРО-ЭНДОКРИННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ

В работах Клоцша (Klotzsche, 1955) и Юнга (Jung, 1957) было показано, что токсические дозы ФОС вызывают у крыс нейтрофильный лейкоцитоз, повышение уровня сахара и хлоридов в крови и снижение уровня калия. Е. И. Спыну (1959) установила, что меркаптофос в субтоксических дозах вызывает у крыс снижение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках. По данным С. Д. Заугольникова (1962), при отравлении животных ФОС у них наблюдается лимфопения и эозинопения. Как справедливо отмечает автор, этот эффект не может быть объяснен антихолинэстеразным действием ФОС и характеризует не связанное с ним влияние на гипофиз-адреналовую систему. Об этом свидетельствует отсутствие антагонизма между ФОС и холинолитиками в осуществлении указанных эффектов (Георгиу и др., 1959; С. Д. Заугольников, 1959) и возможность достижения лечебного эффекта в случае понижения функции коры надпочечников при отравлении животных ФОС с помощью 17-оксикортикостероидов (Ninagava, 1958).

В то же время нельзя полностью исключить и возможный холинергический механизм регуляции гипофиз-адреналовой системы. По данным японских авторов (Shimazu, Sayers, 1954), стимуляция холинергической области гипоталамуса приводит к угнетению секреции гипоталамическими ядрами гормона, являющегося непосредственным стимулятором секреции АКТГ. В то же время блокирование холинергических структур центральной нервной системы приводит к повышению уровня 17-оксикортикостероидов в крови и усилению кортикальной активности гипофиза (А. Н. Поскаленко, 1957, 1958).

С точки зрения патогенеза интоксикации ФОС угнетение гипофиз-адреналовой системы является неблагоприятным фактором, так как именно эта система обеспечивает нормальное функционирование защитных реакций организма, столь необходимых для борьбы с интоксикацией.

ВЛИЯНИЕ

Влияние а  
нервную систе  
охватывает са  
нервной систем  
мозга и кончая  
Однако далеко  
холинэстеразны  
определенность  
действием, кот  
центральные э  
все еще недост  
влиянию антих  
ную систему уд  
нотой изложит

Для понима  
эстеразного ве  
изучение его с  
ский барьер, п  
вопроса.

Проникно

Эксперимен  
холинэстеразны  
от друга по ст  
отчетливые ра  
четвертичными

Так, напри  
лический барь  
азот прозерин  
дит через барь  
заметные коли  
группы эзерин  
ние) приводит  
zer, Stedmann

Различия в  
занные с неод  
энцефалически

Более под  
ных веществ  
примере ФОС

Так, Я. С.  
лог изосисток  
угнетает



## ВЛИЯНИЕ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Влияние антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему чрезвычайно многообразно и сложно. Оно охватывает самые различные отделы и функции центральной нервной системы, начиная от изменений деятельности спинного мозга и кончая нарушением высшей нервной деятельности. Однако далеко не все проявления центральной активности антихолинэстеразных веществ изучены достаточно полно. Можно с определенностью сказать, что по сравнению с периферическим действием, которое исследовано весьма полно и углубленно, центральные эффекты антихолинэстеразных веществ изучены все еще недостаточно. Именно поэтому мы считали нужным влиянию антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему уделить заслуженное внимание и с возможной полнотой изложить имеющиеся по этому вопросу материалы.

Для понимания центральных эффектов любого антихолинэстеразного вещества прежде всего представляется важным изучение его способности проникать через гемато-энцефалический барьер, поэтому изложение мы начинаем именно с этого вопроса.

### Проникновение через гемато-энцефалический барьер

Экспериментальным путем установлено, что различные антихолинэстеразные вещества могут значительно отличаться друг от друга по степени проникновения из крови в мозг. Наиболее отчетливые различия были обнаружены между третичными и четвертичными соединениями.

Так, например, эзерин легко проникает через гемато-энцефалический барьер, в то время как содержащий четвертичный азот прозерин в обычных дозах, по-видимому, вовсе не проходит через барьер, и только при введении его в больших дозах заметные количества проникают в мозг. Превращение веществ группы эзерина в четвертичные соединения (йодметилирование) приводит к ослаблению центрального действия (Schweitzer, Stedmann, Wright, 1939).

Различия в центральных эффектах эзерина и прозерина, связанные с неодинаковой способностью проникать через гемато-энцефалический барьер, представлены в табл. 23.

Более подробно вопросы проникновения антихолинэстеразных веществ через гемато-энцефалический барьер изучены на примере ФОС.

Так, Я. С. Смусин (1957) показал, что сульфониевый аналог изосистокса (метилсульфометилат) значительно слабее угнетает холинэстеразу мозга по сравнению с действием самого



Таблица 23

Сравнительная характеристика некоторых центральных эффектов эзерина и прозерина при их внутривенном введении

Место действия и эффект	Эзерин	Прозерин
Спинномозговые рефлекс Клетки Реншоу	Сильное действие Значительное удлинение разрядов, вызывание спонтанных разрядов	Слабый эффект Отсутствие или слабый эффект
Дыхательный центр Сосудодвигательный центр	Выраженный эффект Подъем кровяного давления центрального происхождения Изменение ЭЭГ (реакция пробуждения)	Слабый эффект Отсутствие эффекта То же
Стабилизация ацетилхолина в мозгу	Увеличение содержания ацетилхолина в мозгу	Количество ацетилхолина в мозгу не изменяется

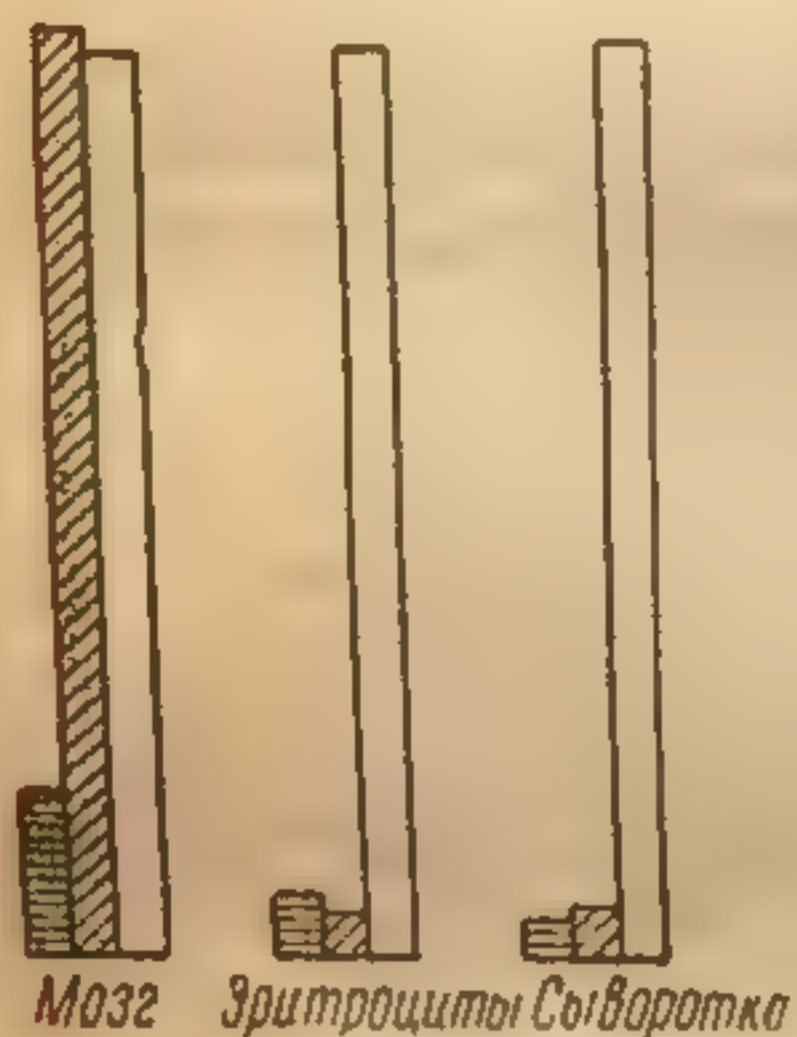


Рис. 31. Влияние препарата Ш-68 и его метилсульфометилата (Ш-69) на активность холинэстеразы мозга, эритроцитов и сыворотки белых крыс (Ю. С. Каган, 1962).

Препараты вводились внутривенно в дозе, равной  $LD_{50}$ . Столбики: с горизонтальной штриховкой — Ш-68; с косой — Ш-69; белые — контроль.

изосистокса. Такой же эффект был получен при сульфометилировании других ФОС (Я. С. Смусин, 1958).

Согласно данным Ю. С. Кагана (1962), *s*-( $\beta$ -этилмеркаптоэтил)-диэтилтиофосфинат (Ш-68) и его сульфониевый аналог (Ш-69) также сильно отличаются один от другого по степени проникновения через гемато-энцефалический барьер. Препарат Ш-69, содержащий заряд, практически не угнетает холинэстеразу мозга, в то время как препарат Ш-68, лишенный заряда, полностью ингибирует фермент. В отношении влияния на активность холинэстеразы эритроцитов и сыворотки крови оба препарата были равноценны (рис. 31).

Еще более показательные данные были получены Э. В. Зеймаль (1962) на примере одного из ФОС, содержащего сульфониевую группы (препарат Гд-42). Из сравнения уровня и скорости нарастания концентрации ФОС в мышце и мозгу лягушки (концентрация устанавливалась по калибровочной кривой, полученной с тем же препаратом в опытах с угнетением холинэстеразы *in vitro*) видно,

что препара  
совсем не  
только пр  
Аналог  
наково хор  
газаник  
Наличи  
азоте обле  
были синт  
что Гд-107  
проникает  
мя как Г  
мозг еще  
упомянут  
довиков,  
М. И. Ка  
хельсон,  
Близки  
ли получе  
нером (К  
при срав  
ния ФО  
своей мол  
четвертич  
И в это  
ния, име  
ный зар  
плохо пр  
в мозг. Г  
препарат  
гисто-гем  
было зн  
по выра  
органы.  
ставлени  
эстеразн  
в их де  
мысль н  
рых хол  
вестно,  
вызыван  
(С. Н.  
тщатель  
(McIsaa  
было по  
введено  
внутри



что препарат чрезвычайно легко проникает в мышцы и почти совсем не попадает в мозг (проникновение в мозг отмечается только при значительном повышении дозы) (рис. 32).

Аналогичный препарат, не содержащий заряда (Гд-7), одинаково хорошо проникает как в мышцы, так и в мозг (Л. Г. Магазаник и И. В. Семенов, 1962).

Наличие тяжелого жирного радикала при четвертичном азоте облегчает проникновение вещества в мозг. В связи с этим были синтезированы препараты Гд-107 и Гд-108. Оказалось, что Гд-107 беспрепятственно

проникает в мозг, в то время как Гд-108 проникает в мозг еще хуже, чем вышеупомянутый Гд-42 (Н. Н. Годовиков, Э. В. Зеймаль, М. И. Кабачник, М. Я. Михельсон, 1962).

Близкие результаты были получены Кёлле и Штейнером (Koelle, Steiner, 1956) при сравнении распределения ФОС, содержащих в своей молекуле третичный и четвертичный атомы азота. И в этом случае соединения, имеющие положительный заряд, исключительно плохо проникали из крови в мозг. Прохождение тех же препаратов через другие

гисто-гематические барьеры было значительно более быстрым. Об этом можно судить по выраженности их эффектов на глаз, кишечник и другие органы. Можно, однако, допустить, что при специальном сопоставлении проникновения третичных и четвертичных антихолинэстеразных веществ через другие гисто-гематические барьеры в их действии будет обнаружена большая разница. На эту мысль наводят данные, полученные при исследовании некоторых холинолитических препаратов, в отношении которых известно, что третичные соединения при внутривенном введении вызывают более выраженный мидриаз, чем четвертичные (С. Н. Голиков и др., 1962), а также весьма любопытные и тщательные опыты Кёлле (1957, 1959) и Мак Исака и Кёлле (McIsaak, Koelle, 1959), в которых гистохимическим методом было показано, что ФОС, содержащее третичный азот, будучи введено внутривенно, угнетает холинэстеразу как вне, так и внутри клеток вегетативных ганглиев кошки, в то время как

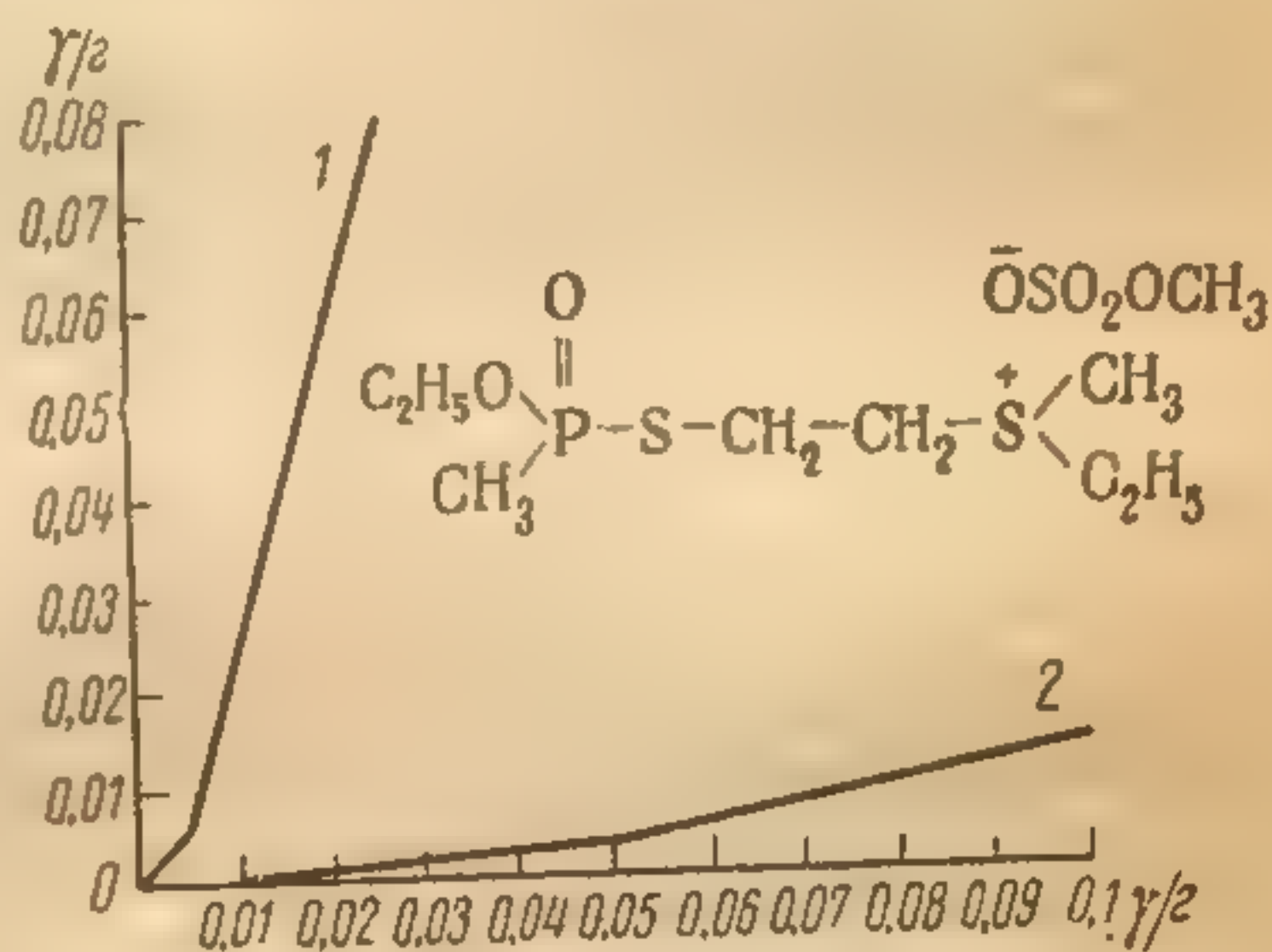


Рис. 32. Проникновение препарата Гд-42 в мозг и мышцы лягушки. (Э. В. Зеймаль, 1962).

На оси абсцисс — расчетные концентрации, которые создались бы при равномерном распределении введенной дозы во всем организме; на оси ординат — концентрации, фактически найденные в мозгу и в мышцах.  
1 — мышцы; 2 — мозг.



его четвертичный аналог взаимодействует лишь с наружной холинэстеразой и не проникает внутрь клетки.

Распределение в центральной нервной системе ионизированных и неионизированных ингибиторов холинэстеразы различно и в случае их введения в желудочки мозга. Если липодорастворимые препараты только в первое время действуют локально, а затем сравнительно быстро распространяются по другим отделам мозга, то полностью ионизированные соединения и при таком способе введения действуют преимущественно локально (Bhawe, 1958).

Фосфорилхолины как вещества, содержащие четвертичный атом азота, по-видимому, плохо проникают через гемато-энцефалический барьер, хотя полностью исключить возможность их проникновения, особенно в случае применения больших доз, по-видимому, нельзя (Fredriksson, 1957, 1958; Koelle, Steiner, 1957). При этом следует иметь в виду, что фосфорилхолины сравнительно легко проникают через другие гисто-гематические барьеры (желудочно-кишечный тракт, глаз, кожа). Сопоставление исключительно малых смертельных доз фосфорилхолинов с теми большими дозами, введение которых сопровождается прониканием в мозг, позволяет утверждать, что механизм токсического действия этих соединений в значительной мере, если не полностью, объясняется их периферическими эффектами.

Большинство ФОС, не содержащих заряда, хорошо проникают через гемато-энцефалический барьер, однако и среди них, по-видимому, имеются различия.

Как показал В. А. Печенкин (1961), такие ФОС, как фосфакол, ТЭПФ и ДФФ, хотя и не сильно, но все же отличаются друг от друга по способности проникать через гемато-энцефалический барьер. Гроб и Харви (Grob, Harvey, 1958) подчеркивают, что зарин, имеющий более высокий коэффициент распределения масло — вода, чем ТЭПФ, обладает более выраженным действием на ЦНС. Октаметил, хотя и не является оиевым соединением, в мозг проникает очень плохо, в то же время он увеличивает проницаемость гемато-энцефалического барьера для других соединений.

Фроули и др. (Frawley et al., 1952) сравнивали проницаемость гемато-энцефалического барьера для шести фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы с помощью измерения уровня холинэстеразы мозга и не установили корреляции с тяжестью симптомов. Так, у животных, получивших ДФФ, начальные явления интоксикации наблюдались при угнетении активности холинэстеразы мозга на 8%, в то время как паратион, ТЭПФ и E-838 вызывали одинаково серьезные симптомы только в случае угнетения активности фермента соответственно на 20, 51 и 26%. Авторы, сравнивая эти показатели, пришли к заключению, что степень угнетения активности холинэстеразы

мозга не опр  
способность  
барьер не от  
центральной

Такой вы  
антихолинэсте  
холинэстеразу

Однако в дей  
Опыты Кэ

1959) и Флей

что угнетение  
ределенных с

только соотве  
ли и др. (195

токсического  
сти холинэст

сравнивать у  
структурах м

именно этим  
этого и не м

данными.

К вопросу  
ности холинэ

речь идет о  
важно подчер

мость в разл

одинакова, и

щество в не

личных стру

ляется и др

уровень акт

мозга, что н

мента.

Э. В. Зей

препаратом

разная акти

ного мозга,

ной активнос

тенной на 9

ти в 30 ра

тена только

Наряду с

мато-энцефа

в мозгу нел

мих антихо

проявлять с

деленной ст



мозга не определяет тяжести симптомов и что, таким образом, способность ФОС проникать через гемато-энцефалический барьер не ответственна за их токсические эффекты со стороны центральной нервной системы.

Такой вывод можно было бы сделать, если допустить, что антихолинэстеразные вещества в одинаковой степени угнетают холинэстеразу во всех отделах центральной нервной системы. Однако в действительности дело обстоит иначе.

Опыты Кёлле (Koelle, 1957a, 1957b; Koelle W., Koelle G., 1959) и Флейшера и др. (Fleisher et al., 1958 a, б, в) показали, что угнетение холинэстеразы может быть избирательным в определенных структурах мозга, но это может быть обнаружено только соответствующим методом. Методическая ошибка Фроули и др. (1952) состоит в том, что они сопоставляли симптомы токсического действия ФОС с суммарным угнетением активности холинэстеразы мозга, в то время как необходимо было сравнивать угнетение холинэстеразы в отдельных клеточных структурах мозга с теми функциями, которые регулируются именно этими структурами. Само собой разумеется, что авторы этого и не могли сделать, так как не располагали подобными данными.

К вопросу о правомочности сопоставлений угнетения активности холинэстеразы мы еще вернемся. Здесь же, поскольку речь идет о проницаемости гемато-энцефалического барьера, важно подчеркнуть, что, по всей вероятности, его проницаемость в различных отделах центральной нервной системы неодинакова, и этим можно объяснить, почему одно и то же вещество в неодинаковой степени угнетает холинэстеразу в различных структурах мозга. Однако не менее важным представляется и другой фактор, а именно — неодинаковый исходный уровень активности холинэстеразы в различных структурах мозга, что не может не сказаться на степени угнетения фермента.

Э. В. Зеймаль (1963) показала, что угнетение холинэстеразы препаратом Гд-42 тем больше, чем ниже исходная холинэстеразная активность данного отдела мозга. Так, в коре головного мозга, где, по данным автора, коэффициент холинэстеразной активности составляет 86, холинэстераза оказалась угнетенной на 95%, а в хвостатом ядре, где этот коэффициент почти в 30 раз выше (см. табл. 24), холинэстераза была угнетена только на 23%.

Наряду с факторами проницаемости различных участков гемато-энцефалического барьера и распределением холинэстераз в мозгу нельзя не учитывать и избирательность в действии самих антихолинэстеразных веществ, каждое из которых может проявлять большую активность по отношению к какой-то определенной структуре мозга.



Таблица 24

Холинэстеразная активность разных отделов мозга кошки в норме  
(Э. В. Зеймаль, 1963)

Отдел мозга	Разведение	Коэффициент холинэстеразной активности в $\mu\text{моль} \cdot \text{г}/\text{ч}$ (среднее с доверительными границами при $P=0,05$ )
Спинной мозг . . . . .	1:5	124 (114—134)
Продолговатый мозг . . . . .	1:10	256 (203—309)
Средний мозг . . . . .	1:15	382 (344—420)
Мозжечок . . . . .	1:30	673 (648—698)
Хвостатое ядро . . . . .	1:75	2169 (1846—2492)
Кора . . . . .	1:5	86 (63—109)

Отсюда следует, что на основании измерения уровня активности холинэстеразы мозга нельзя сделать безупречных выводов о проникновении антихолинэстеразного вещества из крови в мозг. Гораздо более адекватными методами в данном случае будут являться приемы, позволяющие непосредственно определять количества вещества, проникшего из крови в мозг. К таким методам относится, в частности, метод введения в организм животных радиоактивных антихолинэстеразных соединений, но он почти не использовался для указанных целей.

Определенные преимущества перед другими методами имеет также и метод перфузии желудочков головного мозга, получивший большое распространение (Bhattacharya, Feldberg, 1958). Последний состоит в перфузии желудочков мозга кошки через латеральный желудочек и собирании перфузата из цистерны и водопровода при помощи канюли. Оказалось, что при внутривенном введении эзерина и прозерина первый быстрее и в больших количествах (в 20 раз) проникал из крови в мозг и обнаруживался в перфузате (Bhattacharya, Feldberg, 1958).

## Влияние на рефлекторную деятельность спинного мозга

О действии эзерина и других антихолинэстеразных веществ на спинномозговые рефлексы накоплена большая литература. Она касается влияния этих веществ на спинной мозг как холоднокровных, так и теплокровных животных. Данные о влиянии на рефлекторную деятельность спинного мозга эзерина и прозерина обобщены в работах Г. Н. Сорохтина и, в особенности, в его монографии «Атония нервного центра» (1961). Что касается исследований, посвященных влиянию на спинной мозг фосфорорганических соединений, то они в большой своей части остались несистематизированными и разрозненными. Этот пробел не восполнили и обзоры по токсикологии и фармакологии



ФОС, вышедшие в последнее время (Holmstedt, 1959; Heath, 1961), в которых данные о влиянии ФОС на спинномозговые рефлексы изложены сжато и схематично.

### Действие эзерина и прозерина

В опытах на лягушках было впервые установлено, что эзерин повышает рефлекторную возбудимость спинного мозга (Bonnet, Bremer, 1837; Г. Н. Сорохтин и Ф. Е. Позняков, 1948). Стимулирующее влияние эзерина на спинной мозг было подтверждено в опытах со стрихнином, эффект которого усиливался при введении эзерина (Г. Н. Сорохтин и М. С. Рейзен, 1948). Действие эзерина на спинной мозг воспроизведено в опытах с изолированным кровообращением (Г. Н. Сорохтин и М. С. Рейзен), нанесением эзерина непосредственно на спинной мозг (А. А. Зубков, 1940; А. Н. Кабанов, 1947) и погружением спинного мозга в раствор эзерина (А. А. Кириллова, 1943). В большинстве из приведенных опытов было показано, что с увеличением концентрации растворов эзерина наступает парабихотическая фаза, сопровождающаяся возрастанием латентного периода рефлексов и удлинением абсолютной рефрактерной фазы нерва.

Аналогичные результаты были получены и в опытах на теплокровных животных, с той, однако, разницей, что в них действие эзерина проявлялось в меньших дозах. Было, в частности, установлено, что при введении эзерина в снабжающую спинной мозг артерию в нем возникают кратковременные разряды — но только в том случае, если введение эзерина производилось в период рефлекторного или гуморального (инъекция ацетилхолина) возбуждения спинного мозга (Feldberg, Gray, Perry, 1953). Еще убедительнее первичный центральный механизм этого эффекта был показан в работе Бюльбринга и Берна (Bulbring, Burn, 1941). Осуществив раздельное изолированное кровоснабжение спинного мозга и задней конечности собаки, авторы вызывали импульсацию и соответствующие движения мышц путем введения эзерина или прозерина в перфузионную систему, питающую спинной мозг. Этот эффект снимался атропином.

Систематическое изучение действия эзерина на спинной мозг, проведенное Г. Н. Сорохтиным, преимущественно на хронических спинальных животных, позволило прийти к выводу, что эзерин как липодорастворимый препарат в малых дозах действует на спинной мозг экзальтационно (повышает возбудимость) и возбуждающе, тогда как большие дозы вызывают пессимальный эффект.

Ценные результаты о влиянии эзерина и прозерина на спинной мозг были получены методом регистрации скрытого периода



времени рефлекса у кроликов (В. В. Закусов, 1948, 1953; А. В. Вальдман, 1950, 1952). В этих опытах было показано, что эзерин и прозерин укорачивают время скрытого периода ипсилатерального сгибательного рефлекса, т. е. усиливают рефлекторную деятельность спинного мозга. В больших дозах эффект был противоположный (табл. 25).

Таблица 25

Влияние эзерина и прозерина на скрытый период ипсилатерального сгибательного и перекрестного разгибательного рефлексов (А. В. Вальдман, 1952)

Вещество	Дозы (мг/кг)			
	уменьшение	увеличение	уменьшение	увеличение
	скрытого периода ипсилатерального сгибательного рефлекса		скрытого периода перекрестного разгибательного рефлекса	
Эзерин . . . . .	0,02	0,1	0,02	0,04
Прозерин . . . . .	0,01	0,02	0,005	0,01

Близкие результаты были получены тем же методом Д. С. Пасковым (1958) в опытах с нивалином.

Проведенный А. В. Вальдманом анализ приведенных в таблице данных показал, что в случае угнетающего влияния препаратов больше страдают рефлекторные реакции, вызванные раздражением афферентного нерва, по сравнению с реакциями в ответ на раздражение пирамидных путей. Как видно из приведенных в таблице доз, прозерин был несколько активнее эзерина. Однако в опытах Куртиса и Икклса (Curtis, Eccles, 1958) в действии на клетки Реншоу были получены противоположные результаты. Меньшая эффективность прозерина связана в этих опытах с его недостаточной проницаемостью через гемато-энцефалический барьер (при введении прозерина непосредственно в спинной мозг, т. е. минуя барьер, он был даже эффективнее эзерина). В случае развития гиперполяризации мотонейрона и вставочного нейрона (спинальный шок) эзерин оказывает благоприятное действие (Г. Н. Сорохтин, 1945, 1961; М. Г. Дурмишьян, 1955).

Данные различных авторов о влиянии эзерина и прозерина на спинномозговые рефлексы суммированы в табл. 26.

### Действие ФОС

Следующим этапом в изучении действия на спинномозговые рефлексы антихолинэстеразных веществ явились работы с фосфорорганическими соединениями. Изучалось действие большого количества ФОС (ДФФ, ТЭПФ, паратион, фосфакол, мер-

Таблица 26

Влияние антихолинэстеразных веществ на рефлекторную деятельность спинного мозга теплокровных животных (сводные данные)

Автор

Эффект

Рефлекторная реакция

Вид животного



Таблица 26

Влияние антихолинэстеразных веществ на рефлекторную деятельность спинного мозга теплокровных животных  
(сводные данные)

Способ введения и доза	Вид животного	Рефлекторная реакция	Эффект	Автор
0,1—0,5 мг внутривенно	Децеребрированные и спинальные кошки	Эзери Коленный рефлекс	Усиление	Schweitzer et al., 1937, 1939
Субдурально и внутривенно	Собаки	Сгибательный рефлекс и коленный рефлекс	Усиление постоянно	Merlic, Lawson, 1939
0,2—0,5 мг внутривенно	Спинальные кошки	Разгибательный рефлекс	Усиление	И. С. Беритов и А. Н. Бакуридзе, 1940
1—4 мг внутривенно	Децеребрированные кошки	Разгибательный тонус	Усиление	Calma, Wright, 1944
0,1—5,0 мг внутриартериально	Спинальные собаки	Коленный рефлекс	Ослабление	Bülbring, Burn, 1941
0,02—0,1 мг субдурально	Спинальные кошки	Сгибательный и разгибательный рефлексы	Усиление	Calma, Wright, 1947
$1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ внутрь мозга	Спинальные кошки	Спинномозговые рефлексы	Усиление	А. Н. Кабанов, 1947
0,2—0,3 мг/кг внутримышечно	Спинальные собаки	Спинномозговой разгибательный рефлекс, тонус перекрестного спинного рефлекса	»	Г. Н. Сорохтин и А. С. Супруненко, 1952



Способ введения и доза	Вид животного	Рефлекторная реакция	Эффект	Автор
0,02—0,1 мг/кг	Кролики	Скрытый период ипсилатерального сгибательного рефлекса Скрытый период перекрестного разгибательного рефлекса	Уменьшение (в малых дозах) Увеличение (в больших дозах)	А. В. Вальдман, 1952
Внутриартериально 0,1—0,2 мг/кг	Кошки	Моносинаптический разгибательный и полисинаптический сгибательный рефлексы. Моносинаптический сгибательный рефлекс	Усиление Угнетение	А. В. Вальдман, 1952 Taverner, 1954
Внутривенно	Спинальные кошки	Моносинаптический разгибательный рефлекс, полисинаптический рефлекс Моносинаптический сгибательный рефлекс	Усиление Действие неопределенное	Haase et al., 1957
0,005—0,01 мг/кг	Кролики	Прозерин Скрытый период ипсилатерального сгибательного рефлекса. Скрытый период перекрестного экстензорного рефлекса	Укорочение (в малых дозах). Увеличение (в больших дозах)	А. В. Вальдман, 1952
Внутривенно	Спинальные кошки	Моносинаптический разгибательный рефлекс, полисинаптический сгибательный рефлекс Моносинаптический сгибательный рефлекс	Усиление Действие неопределенное	Haase et al., 1957
Внутривенно	Кролики	Нивалин Скрытый период флексорного рефлекса  Табун	Укорочение (в малых дозах), удлинение (в больших дозах)	Д. С. Пасков, 1958



Внутривенно

Спинальные кошки

Скрытый период ипсилаторального сгибательного рефлекса.

Скрытый период перекрестного экстензорного рефлекса

Моносинаптический разгибательный рефлекс, полисинаптический сгибательный рефлекс  
Моносинаптический сгибательный рефлекс

Укорочение (в малых дозах).

Увеличение (в больших дозах)

Усиление

Действие на спинальные рефлексы

А. В. Платонов, 1952

Haase et al., 1957

15 С. Н. Голиков, В. И. Розентарт

Внутривенно

Кролики

Н и в а л и н

Скрытый период флексорного рефлекса

Укорочение (в малых дозах), удлинение (в больших дозах)

Д. С. Пасков, 1958

Внутриартериально 5—10 γ

Децеребрированные, декапитированные и спинальные кошки

Т а б у н

Моносинаптический разгибательный рефлекс

Снижение биопотенциалов; первоначальное увеличение амплитуды потенциала

Scoglund, 1952

Внутриартериально (малые дозы)

Полисинаптический сгибательный рефлекс

При введении больших доз — угнетение всех рефлексов

Holmstedt, Scoglund, 1952

Внутриартериально

Полисинаптический сгибательный рефлекс  
Моносинаптический рефлекс

Облегчение

Holmstedt, 1954

Внутривенно

Спинальные кошки

Положительный межсинаптический потенциал спинного мозга

Усиление

Berngardt, Scoglund, 1953

0,2 мг в спинномозговой канал

Кошки

Моно- и полисинаптический сгибательный рефлекс и полисинаптический разгибательный рефлекс

Угнетение

Haase et al., 1957

Внутриартериально 5—10 γ

Децеребрированные, декапитированные и спинальные кошки

Сгибательный рефлекс

Усиление, в больших дозах — угнетение

Chennels et al., 1951

Резкое подавление

Holmstedt, Scoglund, 1953



Способ введения и доза	Вид животного	Рефлекторная реакция	Эффект	Автор
Внутривенно	Спинальные кошки	Д Ф Ф		Haase et al., 1957
		Моносинаптический разгибательный рефлекс	Усиление	
		Моносинаптический сгибательный рефлекс	Усиление или ослабление	
Внутриартериально 0,7 мг/кг	Децеребрированные и спинальные кошки	Полисинаптический сгибательный рефлекс	Усиление	Chennels et al., 1951
		Коленный рефлекс и сгибательный рефлекс	Усиление, большие дозы — подавление	
200 γ в четвертый желудочек мозга	Децеребрированные кошки	Спинномозговые рефлексы	Без изменений, большие дозы — угнетение	Л. М. Бресткина, 1962
Внутриартериально 0,12—0,4 мг/кг	Децеребрированные и спинальные кошки	Т Э П Ф		Chennels et al., 1951
		Коленные и сгибательные рефлексы	Усиление	
Внутривенно	Кошки	П а р а т и о н		Erdman, Schaefer, 1954
		Полисинаптические рефлексы	Полное подавление	
	Спинальные кошки	Моносинаптический разгибательный рефлекс, полисинаптический сгибательный рефлекс	Усиление	Haase et al., 1957
		Моносинаптический сгибательный рефлекс	Усиление или ослабление	
Внутривенно	Спинальные кошки	Ф о с ф а к о л		Haase et al., 1957
		Моносинаптический разгибательный рефлекс, полисинаптический сгибательный рефлекс	Усиление	



Внутривенно

Спинальные кошки

Полисинаптические рефлекс-  
сы  
Моносинаптический разги-  
бательный рефлекс, полиси-  
наптический сгибательный  
рефлекс  
Моносинаптический сгиба-  
тельный рефлекс

Полное подавление  
Усиление  
Усиление или осла-  
бление

Erdman, Schae-  
fer, 1951  
Haase et al., 1957

15\*

Внутривенно

Спинальные кошки

Фосфакол  
Моносинаптический разгиба-  
тельный рефлекс, полисинап-  
тический сгибательный реф-  
лекс  
Моносинаптический сгиба-  
тельный рефлекс  
Скрытый период сгибатель-  
ного рефлекса

Усиление

Haase et al., 1957

Внутривенно  
0,1 мг/кг—0,3 мг/кг

Кролики

Усиление или осла-  
бление  
Укорочение

И. В. Комисса-  
ров, 1957

Кролики

Меркаптофос  
Сгибательный рефлекс

Усиление или осла-  
бление (в зависи-  
мости от дозы)

Ю. С. Каган,  
1961

0,02—0,03 мг/кг вну-  
тривенно

Децеребрирован-  
ные кошки

Пирфос  
Порог рефлекторной возбу-  
димости

Уменьшение,  
в больших дозах —  
увеличение

Л. М. Бресткина,  
1962

30—40 γ в четвертый  
желудочек мозга

Децеребрирован-  
ные кошки

Рефлекторная возбуди-  
мость  
Контрлатеральное торможе-  
ние  
Ипсилатеральное торможе-  
ние

Падение

Л. М. Бресткина,  
1962

Нарушено

Без изменений

Тиофос

Полисинаптический сгиба-  
тельный рефлекс  
Моносинаптический рефлекс

Угнетение

Облегчение

Erdmann et al.,  
1955



каптофос, табун, зарин и др.) в различных условиях опытов. Исследовались моносинаптический сгибательный и разгибательный рефлексы, полисинаптический сгибательный рефлекс. При этом регистрировались величины рефлексов, скрытый период рефлексов, биопотенциалы спинного мозга и эфферентных нервов и другие показатели. Опыты ставились в различных условиях, с общей тенденцией к выявлению непосредственного влияния препаратов на спинной мозг (внутриартериальные и внутрижелудочковые введения веществ, перерезки мозга на различных уровнях).

Все эти данные, а также результаты опытов с другими антихолинэстеразными веществами суммированы в табл. 26. На первый взгляд, приведенный в таблице материал выглядит чрезвычайно пестрым. Однако более внимательное рассмотрение показывает, что несогласованность результатов многих исследований объясняется разными условиями опытов (вид животного, способ введения вещества, характер регистрируемых показателей и др.). Если же сгруппировать однотипные опыты, то их результаты поддаются обобщению. Так, при внутривенном введении в большинстве случаев наблюдалось усиление как моно-, так и полисинаптических рефлексов (величины рефлексов увеличивались, а скрытый период уменьшался). Более постоянными эти результаты были для моносинаптических разгибательных и полисинаптических сгибательных рефлексов. Моносинаптические сгибательные рефлексы в части опытов тоже усиливались, но иногда эффект был противоположным. При увеличении дозы ФОС все рефлексы в большинстве случаев угнетались. Угнетающее действие ФОС на рефлексы более четко обнаруживается при внутриартериальном введении препаратов. Это объясняется тем, что в таких случаях в спинной мозг одномоментно попадает более массивная доза вещества, чем при внутривенном введении; а поскольку для большинства ФОС, особенно таких токсичных, как табун и зарин, диапазон возбуждающих и паралитических доз очень узкий, то четко выявляется и угнетающая фаза.

В этом отношении убедительные данные представили Холмстедт и Скоглунд (Scoglund, 1952; Holmstedt, Scoglund, 1953), которые установили, что табун, как правило, снижает биопотенциалы моносинаптического разгибательного рефлекса и вызывает только первоначальное увеличение потенциалов полисинаптического сгибательного рефлекса, которое также сменяется угнетением. Большие дозы табуна вызывали угнетение всех рефлексов. Эти эффекты во многом напоминают действие на спинной мозг ацетилхолина (Berngard, Scoglund, 1953).

Для правильной оценки данных о влиянии ФОС на спинномозговые рефлексы в различных условиях опытов большое значение имеет работа Хаасе и сотр. (Haase et al., 1957), которые

исследовали  
(эзерина) в  
зарина) в  
иналов с  
ного введе  
вызывали  
полисинап  
моносинап  
были непос  
всегда угне  
прессию все  
ческие реф  
Schaffner, 19  
Возбужд  
вые рефлек  
ственно, пр  
зон доз, вы  
(см. стр. 25  
ния и угнет  
том довольн  
в себе опас  
применении  
дозирования  
Из выше  
ства изменя  
ственного вл  
организма э  
ными суборд  
системе. Так  
эстеразные  
и тормозные  
лярной форм  
мозга (Brook  
шнеся эффек  
мике.  
Л. М. Бре  
торной деяте  
мозга у деце  
ступают в рез  
мозга (по-вид  
как у спиналь  
не наблюдается  
Интересны  
tino et al., 19  
лекса, вызыва  
связано с его  
на те ее нейро



исследовали влияние различных антихолинэстеразных веществ (эзерина, прозерина, ДФФ, фосфакола, паратиона, табуна и зарина) в одинаковых условиях опытов (регистрация биопотенциалов спинного мозга у спинальных кошек после внутривенного введения препаратов). В этих условиях все соединения вызывали усиление моносинаптического разгибательного и полисинаптического сгибательного рефлексов. Что касается моносинаптического сгибательного рефлекса, то его изменения были непостоянными. Исключение представлял табун, который всегда угнетал этот рефлекс. Зарин вызывал преходящую депрессию всех рефлексов. Угнетающее влияние на полисинаптические рефлексy характерно также для тиофоса (Erdmann, Schaffer, 1954).

Возбуждающее действие антихолинэстераз на спинномозговые рефлексy используется в невропатологии. При этом, естественно, предпочтение отдается препаратам, у которых диапазон доз, вызывающих возбуждающее действие, наибольший (см. стр. 252). Возможность воспроизведения эффектов усиления и угнетения спинномозговых рефлексов различными и при том довольно близкими дозами одного и того же вещества таит в себе опасность неприятных осложнений при их практическом применении и диктует необходимость тонкого индивидуального дозирования препаратов.

Из вышеизложенного видно, что антихолинэстеразные вещества изменяют рефлекторные реакции в результате непосредственного влияния на спинной мозг. Однако в условиях целого организма эти отношения могут быть иными в связи с известными субординационными отношениями в центральной нервной системе. Так, в последнее время установлено, что антихолинэстеразные вещества уменьшают и укорачивают облегчающие и тормозные влияния, возникающие при раздражении ретикулярной формации, на моносинаптические рефлексy спинного мозга (Brooks et al., 1956). По мнению этих авторов, наблюдавшиеся эффекты нельзя отнести за счет изменений в гемодинамике.

Л. М. Бресткина (1961) установила, что нарушения рефлекторной деятельности и координационных отношений спинного мозга у децеребрированных кошек под влиянием пиррофоса наступают в результате воздействия на стволую часть головного мозга (по-видимому, на ретикулярно-спинальные нейроны), так как у спинальных кошек нарушений рефлекторной деятельности не наблюдается.

Интересные результаты были получены Домино и др. (Domino et al., 1955), показавшими, что облегчение коленного рефлекса, вызываемое натрий-5-этил (1,3-диметил барбитуратом), связано с его действием на ретикулярную формацию, и именно на те ее нейроны, которые участвуют в облегчении двигательных



рефлексов. Несмотря на то, что использованный авторами препарат не является антихолинэстеразным веществом, эти данные представляют интерес для понимания значения субординационных отношений между стволовой частью мозга и спинным мозгом в осуществлении рефлекторной деятельности.

Большим пробелом в изучении влияния антихолинэстеразных веществ на спинной мозг является отсутствие убедительных данных о роли этих эффектов в комплексе расстройств центральной нервной системы, возникающих при отравлении ФОС и другими близкими соединениями.

Каково патогенетическое значение нарушений функционирования спинного мозга в картине отравления антихолинэстеразными веществами; насколько избирательно их влияние на эту функцию и можно ли воспроизвести его без проявления действия на другие органы в условиях клинического применения? — на эти вопросы экспериментальная фармакология пока не дала окончательного ответа.

На первый из поставленных вопросов предположительно можно ответить, исходя из сопоставления доз антихолинэстеразных препаратов, оказывающих влияние на спинномозговые рефлексы и другие функции центральной нервной системы. Поскольку в большинстве случаев дозы, нарушающие рефлекторную деятельность спинного мозга, превышают дозы, вызывающие другие центральные эффекты, вряд ли правомочно говорить о преимущественном влиянии этих веществ на спинной мозг. Напротив, с большей вероятностью можно говорить о том, что холинореактивные системы спинного мозга менее чувствительны к действию антихолинэстеразных веществ по сравнению с головным мозгом. Известно, что из нескольких синапсов в рефлекторной дуге, идущей к мотонейрону, только один является холинергическим. Кроме того, установлено, что физиологические концентрации ацетилхолина не оказывают влияния на моносинаптические рефлексы спинного мозга (Perry, 1956; Eccles, 1957), а Кеннард (Cennard, 1953) нашел, что микроинъекция ацетилхолина непосредственно в области мотонейронов оказывает очень слабое действие. Таким образом, в оценке влияния антихолинэстеразных веществ на спинной мозг, по-видимому, большее значение следует придавать изменению силы облегчающих и тормозных влияний ретикулярной формации на моносинаптические рефлексы спинного мозга, нежели их непосредственному действию на спинной мозг.

Механизм влияния антихолинэстеразных веществ на спинномозговые рефлексы может быть понят, исходя из современных представлений о строении и функции синапсов спинного мозга. Из работ Икклса и соотр. (Eccles, Fatt, Koketsu, 1954; Eccles R. M., Eccles I. C. a. Fatt, 1956) известно, что между коллатеральным ответвлением двигательного аксона и тормозным вставочным

нейроном  
является  
получает  
Было по  
ные веще  
синапс к  
противоп  
нонофоре  
синаптич

Таким  
рефлексы  
на вставо  
деления т

В пол  
номозгов  
фороргани  
1) сходст  
2) сходст  
3) угнетен  
тагонизм

Из все  
касаются  
зарубежны  
прямой за  
и величин  
(Robinson  
ном изуче  
на колени  
не все про  
рефлексы  
центральной  
что ДФФ  
мозга на  
спинного м  
же уровне  
отчетливые  
мозга. Все  
ственного  
мозг, особ  
проявляют  
холинореак

Влияние на  
Лонго и  
что эзерин  
лекс. Этот



нейроном Реншоу имеется один синапс спинного мозга, который является холинергическим. Этот антидромный тормозящий путь получает коллатерали от двигательного нейрона переднего рога. Было показано, что ацетилхолин, никотин и антихолинэстеразные вещества при внутриартериальном введении возбуждают синапс клеток Реншоу, в то время как  $\beta$ -эритронин оказывает противоположное действие. Этот факт был подтвержден путем ионофоретической инъекции ацетилхолина непосредственно в синаптическую щель (Curtis, Eccles, 1958).

Таким образом, влияние антихолинэстеразных веществ на рефлексы спинного мозга легко объяснить их действием именно на вставочный нейрон, который тормозит мотонейроны путем выделения тормозящего медиатора, природа которого неизвестна.

В пользу антихолинэстеразного механизма нарушения спинномозговых рефлексов под влиянием эзерина, прозерина и фосфорорганических веществ говорят также следующие факты: 1) сходство в действии всех этих веществ (единый механизм); 2) сходство с действием ацетилхолина и его миметиками; 3) угнетение активности холинэстеразы спинного мозга; 4) антагонизм с атропином.

Из всех перечисленных пунктов некоторые несоответствия касаются 3-го пункта. В ряде работ как отечественных, так и зарубежных авторов можно встретить упоминания об отсутствии прямой зависимости между степенью угнетения холинэстеразы и величиной соответствующего эффекта. Так, Робинзон и др. (Robinson et al., 1954) в специальном исследовании, посвященном изучению механизма действия антихолинэстеразных веществ на коленный рефлекс, пришли к выводу, что, по-видимому, не все проявления действия ДФФ и ТЭПФ на спинномозговые рефлексы могут быть объяснены угнетением холинэстеразы в центральной нервной системе. Л. М. Бресткина установила, что ДФФ в дозах, вызывающих угнетение холинэстеразы мозга на 90%, не влияет на рефлекторную деятельность спинного мозга, в то время как от введения пирофоса при таком же уровне угнетения активности холинэстеразы наблюдаются отчетливые нарушения рефлекторной деятельности спинного мозга. Все эти данные говорят в пользу возможного непосредственного действия антихолинэстеразных веществ на спинной мозг, особенно если учесть, что наиболее четко эти эффекты проявляются в больших дозах, для которых прямое действие на холинореактивные системы других органов доказано.

#### Влияние на лабиринтные рефлексы и рефлексы положения тела

Лонго и Наполитано (Longo a. Napolitano, 1954) показали, что эзерин и ДФФ у кроликов облегчают вестибулярный рефлекс. Этот эффект сохраняется и у декортицированных кроли-



ков. Авторы полагают, что это действие связано с влиянием препаратов на рефлекторную дугу вестибулярно-окулярного рефлекса непосредственно или через центры промежуточного мозга. Шефер (Schaefer, 1955) нашел большое сходство в действии на лабиринтные рефлексы морских свинок различных антихолинэстеразных веществ (эзерина, прозерина, ДФФ и тиофоса). Все они вызывали выпадение лабиринтных рефлексов и рефлексов положения тела, происходившее в одинаковой для всех соединений последовательности. Наиболее устойчивыми по отношению к действию антихолинэстеразных веществ оказались тонические реакции. Это подтвердили опыты на кошках, в которых было показано, что реакция позы сохраняется в течение длительного времени, несмотря на применение антихолинэстеразных веществ. Уайт (1956) вводил кроликам ДФФ (0,01—0,32 мг) в хвостатое ядро и установил, что наблюдаемые после введения круговые движения зависят от непосредственного действия вещества на ядро и связаны с угнетением активности холинэстеразы. Существует зависимость между угнетением активности ацетилхолинэстеразы мозга морских свинок табуном и степенью нарушения вестибулярного рефлекса (Diamant, Edith, 1957).

### Влияние на электрическую активность мозга

Первые данные о влиянии антихолинэстеразных веществ на электрическую активность мозга относятся к 1937 г. (Bonnet, Bremer, 1937b). Однако систематическое изучение этого вопроса началось лишь в пятидесятых годах, причем особенно интенсивно исследовалось влияние антихолинэстеразных, как, впрочем, и многих других препаратов, на ретикулярную формацию головного мозга.

В настоящее время фармакология располагает достаточно подробными сведениями о влиянии эзерина, прозерина, галангамина (нивалина), а также различных ФОС на электрическую активность мозга.

Эзерин как в острых опытах, так и у интактных животных в бодрствующем состоянии вызывает изменения электроэнцефалограммы, напоминающие реакцию пробуждения (низкоамплитудная быстрая активность). В острых опытах можно было наблюдать, что этот эффект в определенной степени сохраняется как при перерезке ствола мозга на уровне задних бугров четверохолмия (препарат *encephale isole*), так и при перерезке спинного мозга на уровне  $C_1$  (препарат *cerveau isole*). Атропин устраняет влияние эзерина на электрическую активность мозга. Аналогичный эффект вызывают и другие антихолинэстеразные вещества, за исключением прозерина и, вероятно, других ионизированных веществ, плохо проникающих в мозг.

Эт  
препа  
тельн  
50—1  
га и  
ing, E  
ных

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W

W



Эти эффекты характерны для небольших доз. Применение препаратов в токсических дозах сопровождается более значительными и качественно иными изменениями. Так, тиофос в дозе 50—100 мг/кг вызывает появление  $\beta$ -волн в коре головного мозга и судорожных разрядов в подкорковых образованиях (Duensing, Erdmann, 1954). Особенно характерно появление судорожных разрядов для таких высокотоксичных ФОС, как зарин

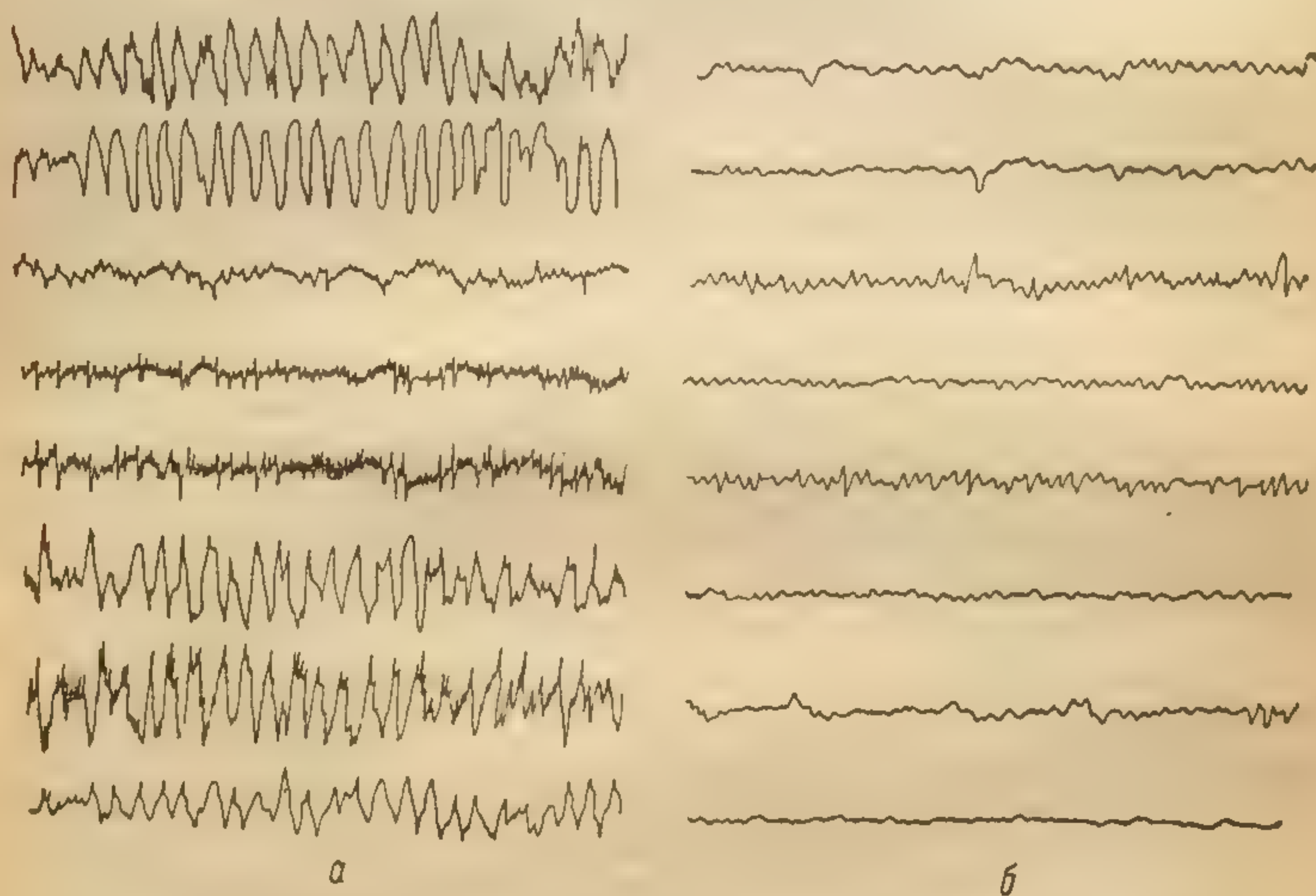


Рис. 33. Влияние зарины на ЭЭГ человека (Grob et al., 1956).

а — ЭЭГ в норме; б — ЭЭГ через 2 недели после контакта с заринном.

(Longo, Nachmansohn, 1960). Согласно наблюдениям Гроба (1956), зарин вызывает у человека изменения ЭЭГ, напоминающие изменения при эпилепсии — нерегулярность ритма, вариабельность потенциалов с тенденцией к усилению, внезапные вспышки медленных волн повышенного вольтажа (рис. 33). Характерно, что судорожные изменения биоэлектрической активности по мере развития интоксикации ослабевают и даже исчезают, хотя судороги у животных продолжаются.

Наибольший интерес для характеристики изменения ЭЭГ представляют опыты на интактных бодрствующих животных, поскольку в этих условиях можно эти показатели сопоставлять с изменением поведения животного. Как известно, у полностью бодрствующего животного в состоянии настороженности можно наблюдать на ЭЭГ лишь быструю активность с малой амплитудой, в то время как у дремлющего животного появляются мед-



ленные волны с высокой амплитудой и вспышки веретен. Таким образом, между электрической активностью и поведением имеется определенная корреляция. После введения бодрствующему животному эзерина (0,1 мг/кг) электрическая активность становилась такой же, как у животного в настороженном состоянии, но в поведении не отмечалось никаких изменений. Только введение больших доз, вызывающих периферические эффекты, изменяло и поведение животного.

Подобную фармакологическую диссоциацию поведения и ЭЭГ впервые наблюдал Уиклер (Wikler, 1952) в опытах с атропином.

Следует учитывать также данные о том, что, как показал А. Б. Коган (1958, 1962), «реакция пробуждения» не совпадает с общим возбуждением коры, а выражает лишь факт рабочей десинхронизации нейронов коры, в результате которой может развиваться как пробуждение, так и торможение. Точно так же возникновение гиперсинхронных и медленных волн нельзя отождествлять с тормозным состоянием. К аналогичному выводу пришел Крейнделер (1958), который не обнаружил достаточно постоянной зависимости между электрокортикографическими изменениями ЭЭГ условнорефлекторных ответов и внешне проявляемой условнорефлекторной реакцией.

Изменения биоэлектрической активности, так или иначе отражающие состояние деятельности различных отделов мозга, могут быть использованы для выяснения точки приложения действия антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему. В этом отношении наибольший интерес представляют опыты на животных, у которых производились перерезки мозга на различных уровнях.

Этот вопрос был исследован различными авторами (см. табл. 27), но наиболее убедительные данные были получены М. Д. Машковским и Р. Ю. Ильюченком (1960, 1961), показавшими, что антихолинэстеразные вещества эзерин и галантамин вызывают активацию ЭЭГ лишь в том случае, когда с корой больших полушарий остается связанной хотя бы часть среднего мозга. На основании этих опытов, а также последующего фармакологического анализа (Р. Ю. Ильюченко, Р. У. Островская, 1962) авторы пришли к выводу, что эта активация связана с изменениями функционирования холинореактивных структур в области ретикулярной формации среднего мозга. Авторы на основании полученного ими фактического материала отвергают гипотезу Бредли, согласно которой антихолинэстеразные вещества действуют не локально на ретикулярную активирующую систему ствола мозга, а «гораздо более диффузно» и оказывают влияние на механизм, не участвующий в изменении поведения (бодрствование и сон). Кроме того, нужно иметь в виду данные об участии мускарино- и никотиночувствительных синапсов

Таблица 27  
Влияние антихолинэстеразных веществ на электроэнцефалограмму (по литературным данным)

Способ введения и доза	Вид животного	Эффект, наблюдаемый после введения препарата	Автор
------------------------	---------------	--	-------



Таблица 27

## Влияние антихолинэстеразных веществ на электроэнцефалограмму (по литературным данным)

Способ введения и доза	Вид животного	Эффект, наблюдаемый после введения препарата	Автор
Внутрикаротидно, малые дозы  0,1 мг/кг  0,1 мг/кг	Кошки, кролики	<b>Эзерин</b> Низкоамплитудная быстрая активность Эффект аналогичен действию ацетилхолина, но более длительный	Bonnet, Bremer, 1937 Bremer, Chatonnet, 1949
		Снижение вольтажа и учащение электроактивности	Funderbruc, Case, 1951; Rinaldi, Himiwich, 1955
	Кролики	Стойкая активация без изменения поведения животного. Антагонизм с действием седативных средств	White, Bodgie, 1959
Внутривенно 0,1—0,3 мг/кг	Кролики и кошки	Реакция пробуждения, которая воспроизводится на препарате «serveau isole» и устраняется амизилом	М. Д. Машковский и Р. Ю. Ильюченко, 1961; Bradly, 1962
0,1 мг/кг	Кураризированные кошки	<b>Прозерин</b> Отсутствие эффекта	Funderbruc, Case, 1951
0,1—0,3 мг/кг	Кошки	Отсутствие эффекта (последний проявляется только после введения прозерина в дозах, оказывающих периферическое действие)	Bradly, 1962
Внутривенно 1—3 мг/кг	Кролики, кошки	<b>Галантамин</b> 1. Реакция пробуждения продолжительностью $1\frac{1}{2}$ — $2\frac{1}{2}$ ч, проявляющаяся в коре одновременно с изменениями в нижележащих отделах мозга. Реакция пробуждения на «serveau isole» от больших доз Антагонизм с амизилом	М. Д. Машковский и Р. Ю. Ильюченко, 1961



Способ введения и доза	Вид животного	Эффект, наблюдаемый после введения препарата	Автор
0,1—4 мг/кг	Кролики	2. Облегчение реакции «следования» в ретикулярной формации (на ритмические световые импульсы)  Н и в а л и н Подавление медленных волн, учащение ритма и увеличение вольтажа средних и мелких волн по типу «реакции пробуждения» Усиление действия ацетилхолина на ЭЭГ	Д. С. Пасков, 1958
Введение в 4-й желудочек	Кошки кураризированные Изолированная кора головного мозга кролика	Появление длительных веретен острых больших волн типа эпилептиформных Усиление судорожной активности при местном нанесении стрихнина на кору головного мозга, десинхронизация	Savoldi, Lapei, 1960
Внутривенно	Кошки и обезьяны	Д Ф Ф Увеличение частоты и уменьшение вольтажа ЭЭГ, которое может быть предупреждено атропином и скополамином	Wescoc et al., 1948
Внутривенно 3 мг/кг	Кошки	Сглаживание характерной прерывистости активности коры препаратов изолированного мозга и активности в форме веретен, характерной для коры мозга животного, находящегося под барбитуратным наркозом. Антагонизм с атропином Нарушения ЭЭГ, подобные нарушениям при эпилепсии (этому соответствует почти полное угнетение активности холинэстеразы) Диффузная десинхронизация (типа «реакции пробуждения»), сходная с действием ацетилхолина, но более длительная. Антагонизм с атропином. Точка приложения — мезодиэнцефалическая область	Bradley et al., 1954  Hampson et al., 1950  Rinaldi, Himwich, 1955

Внутривенно 10 г/кг

Кураризированные кролики

З а р и н

1. Десинхронизация (картина активации), сходная с действием эзерина и звуковым или



эпилепсии (этому соответствует почти полное угнетение активности холинэстеразы)  
Диффузная десинхронизация (типа «реакции пробуждения»), сходная с действием ацетилхолина, но более длительная. Антагонизм с атропином. Точка приложения — мезэнцефалическая область

Rinaldi, Hummel  
1953

Внутривенно 10 γ/кг	Кураризованные кролики	З а р и н 1. Десинхронизация (картина активации), сходная с действием эзерина и звуковым или тактильным раздражениями 2. После повторной инъекции — судорожные разряды (быстрые волны высокой амплитуды 200—300 мв). Антагонизм с атропином и отчасти с ПАМ	Longo et al., 1960
Внутривенно	Собаки	Т Э П Ф Уменьшение вольтажа и увеличение частоты электрических потенциалов, устраняемое атропином	Inoci, Relco, 1953
Внутривенно	Кролики	Т и о ф о с Во всех корковых отведениях выявляется ЭЭГ низкой амплитуды (частота 4—6 кол./сек), чему клинически соответствуют явления возбуждения парасимпатической нервной системы. Вскоре появляются Δ-волны, вслед за которыми биоэлектрическая активность ослабевает и полностью исчезает. Этим изменениям клинически соответствуют судороги и аноксия.	Duesing, Erdmann, 1954
Нанесение на кору area striata	Кролики	Судорожная активность, irradiирующая по коре. Особенно чувствителен дыхательный центр	
Внутримышечно 50—100 мг/кг	Кошки	β-волны (кора); в филогенетически старых образованиях мозга — судорожная активность, переходящая на другие отделы. Большие дозы атропина эффективны, но только в отношении филогенетически старых образований, в которых, по мнению автора, имеется холинергическая передача. При общих судорогах атропин не эффективен	



в реакции активации (Riehl, Unna, 1960). Надо полагать, что окончательное выяснение точки приложения действия антихолинэстеразных веществ в центральной нервной системе выяснится в результате дальнейших исследований с помощью микроэлектродной и микроинъекционной техники. Однако уже в настоящее время не вызывает сомнения факт избирательного влияния антихолинэстеразных веществ на холинергические структуры ретикулярной формации среднего мозга. Этим, однако, не отрицаются и возможные влияния антихолинэстеразных веществ на кору головного мозга. В этом отношении заслуживают внимания данные Десмедта и Франкена (Desmedt a. Franken, 1957). Авторам удавалось вызывать реакцию пробуждения путем внутривенного введения эзерина кошкам, у которых предварительно был перерезан мозг на уровне *сogratumilagaе*. В то же время они не наблюдали эффекта у декортицированных животных. Это позволило им прийти к выводу, что изменения ЭЭГ, вызываемые эзеринем, обусловлены преимущественно его действием на кортикальном уровне и меньше — действием на ретикулярную формацию.

Такого же мнения придерживаются и некоторые другие авторы (Machne, Unna, 1963).

При введении ДФФ ацетилхолинэстераза ингибируется в различных отделах мозга неодинаково: после внутривенного введения крысам ДФФ в дозе 1 мг/кг фермент был ингибирован в среднем мозгу на 70%, продолговатом — на 35% и в коре только на 21% (Veigda, 1952). Аналогичные данные приводит Гроб и др. (1950) для человека. Факт преимущественного угнетения холинэстеразы в среднем мозгу и данные о влиянии антихолинэстеразных веществ на структуру этого отдела мозга, по-видимому, отражают известную корреляцию. В то же время наличие достаточно высокой активности холинэстеразы и холин-ацетилазы в других отделах мозга и, в частности, в коре свидетельствует о возможном влиянии этих веществ на другие отделы мозга.

Применяя избирательные ингибиторы холинэстеразы в соответствующих дозах, Десмедт и Ла Грутта (Desmedt, La Grutta, 1955) пришли к выводу, что в фармакологическом эффекте пробуждения большее значение имеет угнетение ложной, а не истинной холинэстеразы.

Есть основания полагать, что при некоторых патологических состояниях, например при сотрясении мозга, происходит освобождение ацетилхолина. Этот процесс при воспроизведении его у животных сопровождается характерными изменениями ЭЭГ, которые могут быть еще более усилены введением ацетилхолина или эзерина. Холинергический характер указанных нарушений доказывается также тем, что они могут быть устранены атропином. В пользу этого говорят и данные П. П. Денисенко (1960,



1962) о возможности предупреждения центральными холинолитиками (амизил, метамизил) экспериментального травматического шока и отека мозга у животных.

Литературные данные о влиянии антихолинэстеразных веществ на биоэлектрическую активность мозга суммированы в табл. 27.

### Влияние на эффекты судорожных и наркотических ядов

Для полноты характеристики влияния антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему следует остановиться на их конвульсивной активности. Известно, что большинство антихолинэстеразных соединений (исключение представляют ониевые соединения, плохо проникающие в центральную нервную систему) в токсических дозах вызывают сильные и продолжительные судороги, накладывающие своеобразный отпечаток на всю картину отравления (см. стр. 269). Методами электроэнцефалографии, перекрестного кровообращения, внутримозгового введения веществ и другими наглядно показано, что первичный механизм судорог состоит в непосредственном действии веществ на центральную нервную систему. Асфиксия, развивающаяся вследствие бронхоспазма и других дыхательных расстройств, и нарушения кровообращения, вероятно, могут усилить судорожное действие ФОС, но не являются ответственными за первичный механизм возникновения судорог, как это полагали Фроули и соавт. (Frawley et al., 1952).

Следует иметь в виду, что судороги неодинаково хорошо выражены у всех видов животных: наиболее отчетливо они проявляются у кошек и собак и значительно слабее у кроликов, крыс, морских свинок и мышей. У лягушек ФОС судорог не вызывают. Резкое двигательное возбуждение при отравлении ФОС более или менее быстро (в зависимости от дозы яда и вида животного) переходит в паралич, предшествующий гибели животных.

Представляют несомненный интерес данные о повышении под влиянием антихолинэстеразных веществ чувствительности животных к судорожным ядам. Установлено, что эзерин и другие антихолинэстеразные вещества усиливают конвульсии, вызываемые стрихнином (Sjöstrand, 1937), пикротоксином, пентилентетразолом и мескалином (Hyde et al., 1949). Эзерин у больных эпилепсией может вызвать изменения ЭЭГ, подобные изменениям при petit mal (Williams, Russel, 1941; Lensy, Vojta, 1960).

Введение высоких доз ДФФ в сонную артерию вызывает судороги (Freedmann и др., 1949), которые могут быть устранены только инъекцией значительных доз, 2—4 мг/кг, атропина или пентафена. Аналогичные нарушения, вызванные внутривенным



введением кролику ЛД<sub>50</sub>. ДФФ, устраняются небольшими дозами атропина.

На этом основании Хит (Heath, 1961) делает вывод о том, что непосредственное действие ДФФ на ЦНС не играет большой роли в механизме смерти кроликов. Вряд ли, однако, с этим можно полностью согласиться, так как в случае внутривенного введения кроликам ДФФ центральные механизмы не были исключены.

При введении животным больших доз антихолинэстеразных веществ, превышающих 4—5 ЛД<sub>50</sub>, интенсивность судорог снижается и преобладают паралитические расстройства. Эти данные находятся в соответствии с многочисленными фактами, свидетельствующими о том, что ацетилхолин и антихолинэстеразные вещества в малых дозах оказывают на холинергические структуры различных органов стимулирующее, а в больших — угнетающее действие. В отношении центральных эффектов это было показано Марацци (Magazzi) еще в 1946 г. Автор установил, что при введении в малых дозах ацетилхолин оказывает на кору стимулирующее действие, в то время как большие дозы, наоборот, вызывают депрессию и подавляют эпилептиформные изменения ЭЭГ, вызванные местным нанесением стрихнина.

Вызываемый некоторыми ФОС «наркотический» эффект (Heath, 1961), по всей вероятности, также объясняется паралитическим действием больших доз. Возможны и другие механизмы возникновения у животных слабости, нарушения координаций и повышенной чувствительности к наркотикам (нарушение периферической нервно-мышечной проводимости по типу блока транспорта ионов Na<sup>+</sup> через мембрану аксона).

В этом отношении заслуживают упоминания следующие факты. Антихолинэстеразные вещества потенцируют не только центральные, но и периферические эффекты морфина (Slaughter, Gross, 1940; Flodmark, Wramner, 1955). Эзерин, прозерин и ДФФ усиливают эффекты как центральных депрессантов, так и стимуляторов (Green, Davies, 1956). Другое объяснение «наркотического» эффекта антихолинэстеразных веществ основывается на данных, свидетельствующих о повышении под влиянием антихолинэстеразных веществ проницаемости гемато-энцефалического барьера для других веществ (Greig, Mayberry, 1951).

### Влияние на высшую нервную деятельность

Уже из первых описаний ядовитого действия эзерина следует, что он оказывает заметное влияние на высшие функции головного мозга. Харнак и Витковский еще в 1876 году указывали на то, что эзерин у людей вызывает резкое нарушение деятельности центральной нервной системы и, в частности, ее высших отделов, которое в начальном периоде интоксикации выра-



жается в возбуждении и беспокойстве, а в последующем, в случае тяжелого течения отравления, переходит в угнетение. По свидетельству одного из первых французских токсикологов — Рабюто, отравление эзерином у человека характеризуется такими симптомами, как безразличие («отравленный смотрит тупо»), вялость, опьянение.

При отравлении людей ФОС описаны следующие проявления нарушения функции высших отделов головного мозга: напряженное состояние, беспокойство, испуг, эмоциональная лабильность, головокружение, бессонница или беспокойный сон с кошмарными сновидениями, легкая или умеренная депрессия. По Гробу и Харви (Grob, Harvey, 1958), легкое отравление заринном сопровождается изменениями ЭЭГ (преимущественно в затылочных зонах) в виде уменьшения вольтажа, а при более выраженных симптомах на ЭЭГ появляются нерегулярные ритмы: различие в потенциалах, периодические всплески атипичных волн, подобных тем, которые наблюдаются у больных эпилепсией (медленные волны повышенного вольтажа).

В последнее время в литературе стали появляться сообщения о психических расстройствах у лиц, перенесших либо острое отравление антихолинэстеразными веществами, либо хроническую интоксикацию. Так, Герсон и Шоу (Gershon, Shaw, 1961) у 16 больных, подвергшихся длительному воздействию фосфорорганических инсектицидов, обнаружили нарушения памяти и внимания, причем у семи больных развилась депрессия, у шести — шизофренический психоз с бредовыми идеями и слуховыми галлюцинациями. Нарушения психики длились не менее 6 месяцев после прекращения контакта с ФОС и исчезли только через год после начала заболевания. Авторы полагают, что в основе изменений психики лежит торможение холинэстеразы мозга. Нарушения психики при отравлении меркаптофосом наблюдал и И. С. Файерман и др. (1962).

В последнее десятилетие были предприняты попытки экспериментального изучения действия антихолинэстеразных веществ на высшую нервную деятельность животных методом условных рефлексов. Предпосылкой для постановки этих опытов послужили работы А. А. Новиковой (1940) и А. Ю. Изергиной (1949), в которых было изучено влияние на условнорефлекторную деятельность животных никотина и ацетилхолина — веществ, сходных по своим физиологическим эффектам с антихолинэстеразными соединениями. В опытах А. Ю. Изергиной ацетилхолин в малых дозах вызывал усиление угасательного и дифференцированного торможения с последующим понижением условных рефлексов, переходящим в запредельное торможение. С. И. Гальперин и Г. Н. Кузьменко (1948) при введении собакам в кровь ацетилхолина (13—62  $\gamma/\text{кг}$ ) наблюдали снижение величины условных рефлексов. Восстановление высшей нервной деятельности



сти наступало только через 5 дней. Близкие результаты были получены и с антихолинэстеразными веществами. В опытах Фунденбрука и Кейса (Funderbruck, Case, 1947) эзерин в дозах 0,06—0,25 мг/кг вызывал нарушения условнорефлекторной деятельности у животных. При введении животному вещества в небольших дозах наблюдалось некоторое усиление рефлекса, увеличение дозы приводило к торможению и выпадению рефлексов. Э. Н. Попова (1961) установила, что эзерин в дозе 0,01 мг/кг укорачивает латентные периоды двигательных условных рефлексов у крыс, а в больших дозах угнетает рефлексы.

Д. С. Пасков (1958) изучал действие нивалина на условные рефлексы у крыс в лабиринте. Полученные им данные показывают, что нивалин в дозах 0,5—2 мг/кг усиливает процессы возбуждения (укорочение скрытого периода и времени побежки). Отрицательный условный рефлекс в большинстве случаев растормаживался. Большие дозы нивалина (3—10 мг/кг) приводили к нарушению высшей нервной деятельности крыс, выражавшемуся в частичном или полном выпадении условных рефлексов. Эти нарушения длились около 2 ч, после чего стереотип условных рефлексов постепенно восстанавливался. Нивалин (2 мг/кг) устранял нарушения условных рефлексов, вызванные атропином в дозе 5 мг/кг.

В отличие от эзерина и нивалина, прозерин, содержащий четвертичный азот, в сопоставимых дозах не влияет на высшую нервную деятельность животных. Это следует из опытов на крысах и собаках, проведенных в лаборатории М. Я. Михельсона (М. Я. Михельсон, Н. В. Саватеев, 1953; Е. К. Рожкова и Н. В. Саватеев, 1954; М. Н. Линючев и Н. В. Саватеев, 1954). В то же время было установлено, что прозерин ослабляет или устраняет нарушения высшей нервной деятельности, вызванные атропином или пентафеном у человека и животных. Объяснение этого факта, вероятно, нужно искать в существовании четкого периферического антагонизма между прозерин и холинолитическими препаратами. Кроме того, прозерин усиливает действие на высшую нервную деятельность ацетилхолина (Г. Н. Сметанкин, 1957). Поскольку в применяемых автором дозах прозерин не проникает из крови в мозг, можно допустить, что этот эффект связан с накоплением и стабилизацией ацетилхолина в крови.

Данные о влиянии на высшую нервную деятельность фосфорорганических антихолинэстеразных соединений изложены почти исключительно в работах отечественных авторов. Е. И. Спыну (1957) изучала действие тиофоса и карбофоса на двигательные пищевые условные рефлексы у кошек. Оба соединения при пероральном введении субтоксических доз вызывали однотипные изменения: через 3 ч после введения препаратов наблюдалось удлинение скрытого периода и времени побежки (изменения по

типу на  
случаях  
не отм  
Ю. С  
ную де  
показат  
меркапт  
Увеличе  
рушения  
как и в  
тической  
ная фаз  
ние усл  
Нару  
сти к в  
ствия Ф  
ботки в  
гических  
личеств  
Е. И. С  
меркапт  
0,8 г/л  
менений  
ция 1 г/  
норефле  
стереоти  
каптофо  
особенно  
ной деят  
гих приз  
личении  
В этом  
шей нер  
сов, вы  
Согла  
дениях  
блюдают  
лых доз  
ности хо  
ла Кало  
на крыс  
ния свид  
действи  
В данно  
клеток к  
ния ацет  
ним, есл



типу наркотической фазы). Интересно отметить, что во всех случаях снижения активности холинэстеразы сыворотки крови не отмечалось.

Ю. С. Каган (1960 а, б) исследовал влияние на высшую нервную деятельность меркаптофоса. Кратковременное увеличение показателей условных рефлексов наблюдалось при введении меркаптофоса в дозе 0,25 мг/кг, которая оказалась пороговой. Увеличение дозы до 1 мг/кг привело к более значительным нарушениям условнорефлекторной деятельности, которые, так же как и в опытах Е. И. Спыну, протекали обычно по типу наркотической фазы. В отдельных случаях наблюдалась парадоксальная фаза. При более сильных воздействиях отмечалось выпадение условных рефлексов на отдельные раздражители.

Нарушения условнорефлекторной деятельности следует отнести к весьма чувствительным показателям токсического действия ФОС, что может иметь практическое значение для обработки в токсикологических лабораториях чувствительных биологических тестов для установления минимально действующих количеств ФОС. В этом отношении представляют интерес данные Е. И. Спыну (1957) о воздействии малых концентраций паров меркаптофоса на кошек. Меркаптофос в концентрациях 0,4—0,8 г/л при однократном 4-часовом воздействии не вызывал изменений условных рефлексов. Пороговой оказалась концентрация 1 г/л, которая вызывала кратковременное понижение условнорефлекторной реакции на свет, выраженное особенно в конце стереотипа. В более высоких концентрациях (2—4,5 г/л) меркаптофос вызывал отчетливые изменения условных рефлексов, особенно у животных с неуравновешенным типом высшей нервной деятельности. При этом у животных не было отмечено других признаков интоксикации, которые возникали только при увеличении концентрации меркаптофоса приблизительно в три раза. В этом случае у животных наблюдались резкие нарушения высшей нервной деятельности (полное выпадение условных рефлексов, выпадение натурального пищевого рефлекса).

Согласно данным Н. К. Стачек (1962), при повторных введениях меркаптофоса нормализация условных рефлексов наблюдается при продолжающемся воздействии на организм малых доз яда, вызывающих прогрессирующее понижение активности холинэстеразы (рис. 34). Аналогичную картину наблюдала Калойнова-Симеонова (Kaloïnova-Simeonova, 1961) в опытах на крысах, отравленных хлортионом. Эти интересные наблюдения свидетельствуют о возможности адаптации организма к воздействию малых доз антихолинэстеразных веществ (см. стр. 281). В данном случае можно допустить «приспособление» корковых клеток к функционированию в условиях избыточного содержания ацетилхолина. Это объяснение кажется тем более вероятным, если иметь в виду большую пластичность корковых функ-



ций. Однако нельзя исключить возможности снижения избыточного уровня ацетилхолина за счет его естественной инактивации каким-либо иным путем, помимо разрушения холинэстеразой, — в частности, его связывание белками (С. Н. Голиков и Ю. Г. Федорчук, 1959). В оценке действия малых доз ФОС на высшую нервную деятельность следует учитывать, кроме того, возможность их положительного влияния. Так, согласно данным Н. В. Саватеева (1957), фосфакол в дозе 0,1 мг/кг, подобно никотину и ареколину, ускоряет образование двигательных оборо-

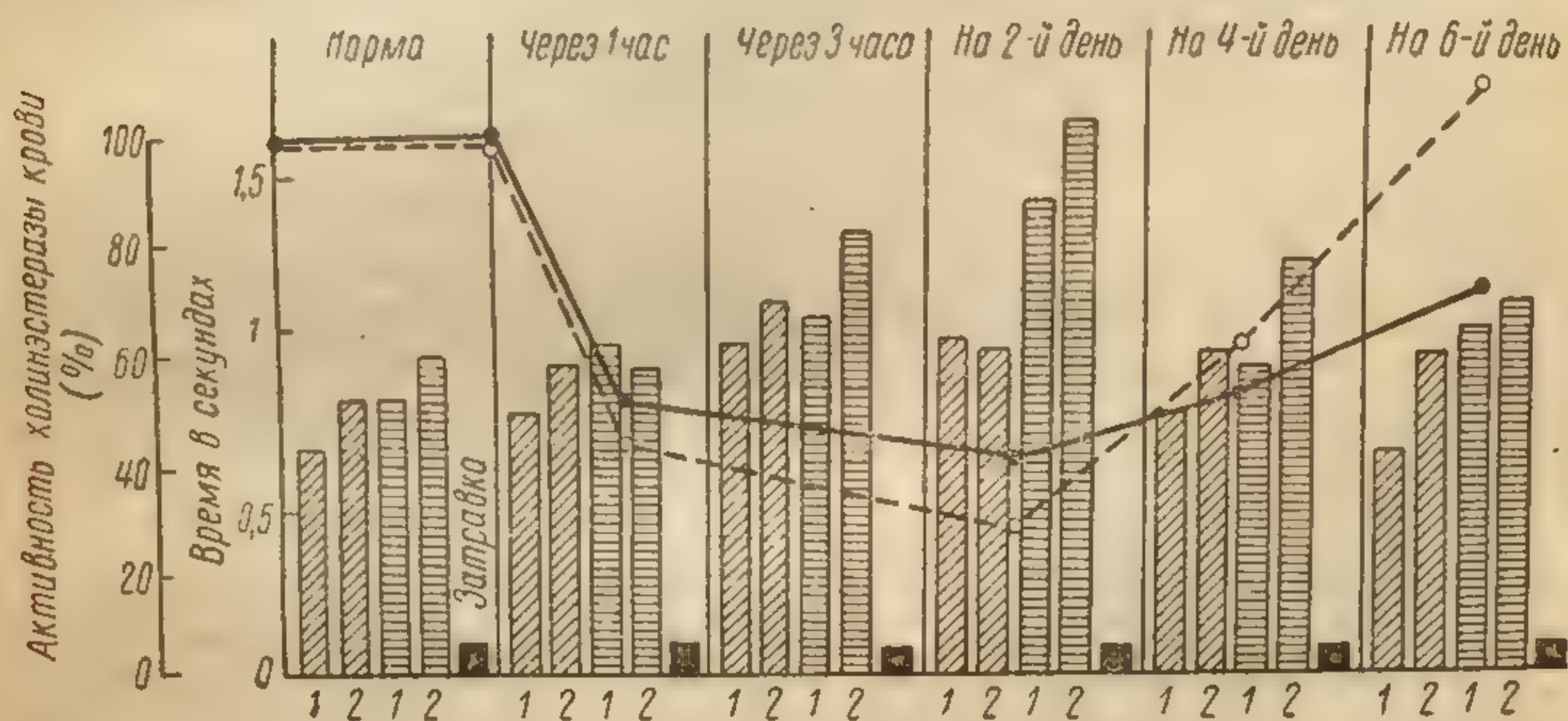


Рис. 34. Изменение активности холинэстеразы эритроцитов сыворотки и условнорефлекторной деятельности кошки при однократном введении метилмеркаптофоса в желудок в дозе 10 мг/кг (Н. К. Стацек, 1962).

Столбики: с косой штриховкой — реакция на зуммер; с горизонтальной штриховкой — реакция на свет; темные — дифференцировочное торможение; 1 — латентный период; 2 — время перебежки. Сплошная линия — активность холинэстеразы эритроцитов; пунктирная линия — сыворотки.

нительных условных рефлексов у мышей и усиливает дифференцировочное торможение. Положительное влияние малых доз ФОС на условные рефлексы сказывается прежде всего в усилении процессов дифференцировочного торможения. Это вытекает из опытов Ю. С. Кагана (1960) на кошках с меркаптофосом и Е. И. Спыну — с тиофосом (1953, 1957).

Тот факт, что в опытах некоторых авторов ФОС не только не улучшали, но даже ухудшали выработку условных рефлексов в лабиринте (Platt, Wickens, 1957) или не оказывали влияния на поведение крыс в лабиринте (Chow, John, 1958), вряд ли можно рассматривать как противоречивый, поскольку авторы, по всей видимости, применяли более высокие дозы веществ.

Вообще говоря, в оценке действия различных доз ФОС на высшую нервную деятельность следует учитывать токсичность соединений. У веществ, обладающих сравнительно невысокой токсичностью, дозы, вызывающие нарушения высшей нервной



деятельности, меньше токсических. Высокотоксичные ФОС, например табуна, у которых диапазон токсических доз очень узок, вызывают нарушения высшей нервной деятельности только в субтоксических и токсических дозах. Согласно данным Г. Котева (1959 а, б), при подкожном введении животным пороговых доз табуна ( $0,01-0,05 \text{ мг/кг}$ ) в течение 6—7 дней возбудимость коры мозга повышалась: укорачивался латентный период условного рефлекса, повышался темп условнорефлекторной реакции, растормаживались дифференцировки. Введение  $\text{LD}_{50}$  ( $0,1 \text{ мг/кг}$ ) вызывало у выживших животных длительные нарушения высшей нервной деятельности с гипнотической фазой. Позже у этих животных периоды заторможенности перемежались с периодами нормальной или повышенной условнорефлекторной деятельности. Отравление  $\text{LD}_{100}$  ( $0,2-0,3 \text{ мг/кг}$ ) прежде всего сказывалось на высшей нервной деятельности: наступало охранительное торможение, затем уже через 8 мин развивались судороги и через 15—17 мин смерть. В случаях, не окончившихся летально, высшая нервная деятельность восстанавливалась только через 10 дней.

Г. Котев (1959 а) при помощи оборонительной условнорефлекторной методики изучал также действие табуна на высшую нервную деятельность собак сильного и слабого типа. При однократном введении животным табуна в дозах  $0,1-0,2 \text{ мг/кг}$  у собак сильного типа преобладали явления возбуждения, а у собак слабого типа — явления запредельного торможения. В последнем случае восстановительный период затягивался до 50 дней. При введении табуна в дозе  $0,3 \text{ мг/кг}$  ( $\text{LD}_{50}$ ) животные слабого типа, как правило, гибли, причем в ранние сроки (1—2 ч после отравления); животные сильного типа либо выживали, либо погибали в поздние периоды (через сутки).

Резюмируя все вышеизложенное, можно заключить, что ФОС, во всяком случае те из них, которые были изучены, обладают двухфазным действием на высшую нервную деятельность в зависимости от дозы. В малых дозах они усиливают дифференцировочное и угасательное торможение, а в больших — приводят к понижению условных рефлексов по типу наркотической фазы. В этой связи уместно отметить, что малые дозы ацетилхолина, по данным А. Ю. Изергиной (1949), подобно ФОС, также способствовали упрочению дифференцировки и облегчали угашение условных рефлексов. Можно полагать, что небольшие дозы ФОС, вызывающие умеренное угнетение холинэстеразы, способствуют накоплению в мозгу таких количеств ацетилхолина, которые облегчают синаптическую передачу и тем самым способствуют усилению процессов внутреннего торможения. Большие дозы, напротив, приводят к накоплению значительных количеств ацетилхолина, препятствующих нормальному ходу трансмиссии.



С этой точки зрения представляют интерес данные о существовании антагонизма между ФОС, а также другими антихолинэстеразными веществами, с одной стороны, и холинолитиками — с другой (М. Я. Михельсон и др., 1957а и б; Н. В. Саватеев, 1957; А. Т. Селиванова, 1957, 1958).

Тот факт, что действие фосфакола на условные рефлексы во многом напоминает картину, вызываемую другими антихолинэстеразными и холиномиметическими веществами, свидетельствует об общности механизмов действия этих соединений на центральную нервную систему и указывает на медиаторную роль ацетилхолина не только в спинном мозгу и подкорковых образованиях, но и в коре головного мозга.

Большой интерес представляют попытки некоторых авторов исследовать условнорефлекторные реакции животных после введения им антихолинэстеразных веществ непосредственно в мозг. Фельдберг и Шервуд (Feldberg, Sherwood, 1954), наблюдали за животными с хронически вживленными канюлями и видели, что при таком способе введения четко выявляются центральные эффекты антихолинэстераз. С. Ф. Наумов (1948) наблюдал изменения условных рефлексов у собак после субдурального введения ацетилхолина. Трачек (Traczyk, 1959) сделал попытку изучения условных рефлексов у собак с вживленными в боковой желудочек мозга канюлями. При введении ацетилхолина (10—150  $\gamma$ ) и прозерина (5—50 мг) отмечалось увеличение латентного периода двигательного оборонительного условного рефлекса, секреторный рефлекс не изменялся. Автор полагает, что холинергические вещества действуют на подкорковые ядра (хвостатое и медиальное).

В дальнейшем методика Фельдберга была модифицирована таким образом, что стало возможным вживлять канюли непосредственно в различные структуры мозга (В. Д. Волкова, М. М. Хананашвили, 1961; А. Т. Селиванова и Н. Н. Лазуко, 1961; Lischak, Endrocchi, 1960).

А. Т. Селивановой и М. А. Разумовой (1963) было показано, что при введении через канюлю в двигательную зону коры головного мозга эзерина в дозе 1—2  $\gamma$  сразу же после микроинъекции наступали изменения пищевых двигательных условных рефлексов по типу усиления возбудительного процесса с последующим переходом в торможение. В этот период действие препарата было строго локализовано областью его введения (гистохимически установлено угнетение холинэстеразы только в месте инъекции).

В настоящее время есть основания считать, что в осуществлении высшей нервной деятельности большую роль играет межнейронная передача, осуществляемая при помощи ацетилхолина. В дополнение к известным фактам, изложенным в соответствующих обзорах (М. Я. Михельсон, 1957а) и свидетельствующим

ших о пра  
также на  
лось пока  
жителя на  
исходит до  
ковых пун  
которого д  
интерес на  
zweig, 195  
сти холинэ  
работки у

Можно  
вызываем  
соединения  
накопления  
предполож  
угнетения  
изменений  
ных веществ  
Однако им  
нервной д  
крови, кот  
ния затрон

Ю. С. К  
жду нару  
пенью угне  
ви (сывор  
рефлексов  
снижение  
лее выраж  
ности.

Е. К.  
деятельнос  
влиянием  
цида — мет  
ли, что изм  
у кошек п  
концентра  
равления.  
с помощью  
ренцирован  
ного услов  
тренного т  
жения акт  
активности  
изменения  
периода и



щих о правомочности такого предположения, можно сослаться также на исследование В. С. Кононенко (1963). Автору удалось показать, что при действии пищевого безусловного раздражителя на одну половину слизистой оболочки рта собаки происходит достоверное снижение активности холинэстеразы в корковых пунктах анализатора именно того полушария, со стороны которого действует пищевой раздражитель. Представляют также интерес наблюдения Крича (Krech, 1956) и Розенцвейга (Rosenzweig, 1958), которые установили зависимость уровня активности холинэстеразы в коре головного мозга крыс от степени выработки у них условных рефлексов.

Можно думать, что нарушения высшей нервной деятельности, вызываемые эзерином, нивалином и фосфорорганическими соединениями, связаны с угнетением холинэстеразы мозга и накоплением ацетилхолина в центральных синапсах. Если это предположение верно, то должна быть связь между степенью угнетения активности холинэстеразы мозга и выраженностью изменений условных рефлексов под влиянием антихолинэстеразных веществ. К сожалению, таких данных в литературе нет. Однако имеются сведения о связи между нарушениями высшей нервной деятельности и угнетением активности холинэстеразы крови, которые также могут быть использованы для рассмотрения затронутого вопроса.

Ю. С. Каган (1961) наблюдал определенное соответствие между нарушениями условнорефлекторной деятельности и степенью угнетения активности холинэстеразы периферической крови (сыворотки и эритроцитов). Начальные нарушения условных рефлексов возникали при угнетении холинэстеразы на 40—60%, снижение активности фермента на 80—90% сопровождалось более выраженными расстройствами высшей нервной деятельности.

Е. К. Стацек (1962) изучала изменения высшей нервной деятельности по пищевой двигательной методике у кошек под влиянием широко применяемого в сельском хозяйстве инсектицида — метилмеркаптофоса. Проведенные исследования показали, что изменения условнорефлекторной деятельности возникали у кошек при воздействии метилмеркаптофоса в таких дозах и концентрациях, которые не вызывают видимых признаков отравления. Наиболее чувствительным показателем, выявленным с помощью функциональных проб (удлинение действия дифференцировочного раздражителя и проба на угашение положительного условного рефлекса), является усиление процессов внутреннего торможения, которое возникало при небольшом снижении активности холинэстеразы (на 15—40%). При угнетении активности фермента на 45% и более наступали отчетливые изменения условных рефлексов (удлинение времени латентного периода и побежки на положительные условные сигналы).



Прямая связь возникновения нарушений высшей нервной деятельности с определенной степенью угнетения активности холинэстеразы была обнаружена в условиях хронической интоксикации крыс. Заметное торможение активности холинэстеразы эритроцитов и сыворотки (на 35—52%) появилось на 29—35-й день, и в это же время у животных возникли нарушения условно-рефлекторной деятельности.

Угнетение холинэстеразы, вызванное локальной микроинъекцией эзерина в кору мозга, также сопровождается нарушениями высшей нервной деятельности (А. Т. Селиванова, М. А. Разумова, 1963).

Все эти факты свидетельствуют о существовании определенной зависимости между угнетением активности холинэстеразы и функционированием высших отделов головного мозга. Однако это вовсе не означает, что любые нарушения высшей нервной деятельности, вызываемые любыми антихолинэстеразными веществами, нужно связывать исключительно с угнетением активности холинэстеразы. Наличие у антихолинэстеразных веществ прямого действия на холинорецепторы, которое у отдельных представителей ФОС выражено довольно сильно, по-видимому, также может явиться причиной нарушений высшей нервной деятельности. Кроме того, нужно иметь в виду, что наряду с химическими группировками, ответственными за угнетение холинэстеразы, в структуре отдельных антихолинэстеразных веществ присутствуют самые различные группировки атомов, которые могут оказывать влияние на организм. Выявление этих эффектов затруднительно, поскольку неизбежно сопровождается угнетением холинэстеразы. Однако все же возможны исключения. Так, Е. И. Спыну наблюдала нарушения условных рефлексов у кошек от карбофоса без какого-либо снижения активности холинэстеразы крови.

#### Эффекты при непосредственном введении в мозг

В связи с тем, что в условиях опытов на целых животных действие антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему чрезвычайно тесно переплетается с периферическими эффектами, рядом исследователей были предприняты попытки изучения их действия при непосредственном введении в мозг. Описание картины, возникающей у кошек при введении им в боковой желудочек мозга (через хронически вживленную канюлю) эзерина, приводят Фельдберг и Шервуд (Feldberg, Sherwood, 1954). Сразу же после введения 10 γ эзерина кошка начала облизываться, у нее появились саливация и слезотечение. Кошка встряхивала ушами, часто чесалась, «умывалась», вылизывала лапы. При введении больших доз (до 100 γ) эта довольно невинная картина сменилась нарушением походки, мышечным напря-

жением,  
зах вызв  
200 γ по  
увеличен  
ступору

Внутр  
учащен  
больших  
вил зави  
линэстер  
дозе 0,1  
10% нор  
тивности  
ным, а в  
не (85%

Опред  
холинэст  
различн  
Уайт (W  
в хвоста  
движения  
целиком  
активнос  
только в  
она оста  
ДФФ до  
турах ста  
ли уровне  
приблиз  
животно  
0,16 мг,  
возникли  
ной (при  
Атропин  
движений  
зывать к  
Инъек  
а. Nitw  
преимуще  
не исклю  
ний. Это  
ДФФ су  
линэстера  
соответст  
Рейтер  
природст  
Автор на



жением, тремором, ступором, кататонией. ДФФ в таких же дозах вызывал аналогичные изменения. При введении ДФФ в дозе 200  $\gamma$  появились явления беспокойства и своеобразные припадки; увеличение дозы до 1 мг через 5 мин приводило к судорогам и ступору. Ацетилхолин действовал сходно с эзерином и ДФФ.

Внутрицистернальная инъекция ТЭПФ собаке потенцирует учащение дыхания в ответ на стимуляцию нерва Гериинга, а в больших дозах тормозит ее (Метц — Metz, 1958). Автор установил зависимость этих эффектов от степени угнетения ацетилхолинэстеразы вблизи от места инъекции. После инъекции ТЭПФ в дозе 0,116 мг/кг, когда уровень активности фермента падал до 10% нормы, отмечалось полное торможение рефлекса. При активности ацетилхолинэстеразы в 40% эффект был неопределенным, а в случае сохранения активности на более высоком уровне (85%) отмечался четкий потенцирующий эффект.

Определенный интерес представляют данные о влиянии антихолинэстеразных веществ при их непосредственном введении в различные отделы мозга на некоторые рефлекторные реакции. Уайт (White, 1956) вводил кроликам ДФФ в дозе 0,01—0,32 мг в хвостатое тело и наблюдал у них продолжительные круговые движения в сторону, противоположную введению. Это действие целиком зависело от действия ДФФ в месте инъекции, так как активность ацетилхолинэстеразы была значительно снижена только в нем, в то время как в противоположном хвостатом теле она оставалась достаточно высокой. Только с увеличением дозы ДФФ до 0,23—0,32 мг угнетение холинэстеразы в других структурах становилось заметным. Дозы ДФФ ниже 0,01 мг снижали уровень активности ацетилхолинэстеразы хвостатого тела приблизительно до 40% исходного уровня, при этом поведение животного оставалось без изменений. При увеличении дозы до 0,16 мг, когда уровень ацетилхолинэстеразы снизился до 21%, возникли стойкие круговые движения. Доза 2 мг была смертельной (при этом уровень активности холинэстеразы был 13%). Атропином можно было предупредить возникновение круговых движений. У животных с удаленной корой ДФФ продолжал вызывать круговые движения.

Инъекции ДФФ в кору не дали подобных результатов (White и Himwich, 1957). Следовательно, круговые движения были преимущественно связаны с действием на подкорку. Однако это не исключает участия коры в возникновении круговых движений. Это видно из того, что при интракаротидном введении ДФФ существует зависимость между угнетением активности холинэстеразы в полушариях мозга и круговыми движениями в соответствующую сторону (Aprison, 1958).

Рейтер (Reitter, 1957) вводил в мозговую цистерну собаки пиридостигмин и вызывал сильное психомоторное возбуждение. Автор наблюдал антагонистические отношения между пиридо-



стигмном и адреналином при таком пути введения. Интересные наблюдения были сделаны Трачком (Traczyk, 1959) над собаками, которым через вживленную в боковой желудочек канюлю вводили 10—150  $\gamma$  ацетилхолина или 5—50 мг прозерина. Оба вещества вызывали сгибание лапы и поворот головы в момент инъекции, саливацию и двигательное возбуждение; при тяжелом отравлении возникали судороги. Интересно отметить, что в наступлении эффектов между ацетилхолином и прозеринном была существенная разница. Действие ацетилхолина наступало сразу и было кратковременным. Прозерин проявлял свое действие не сразу (оно развивалось через 10—15 мин и было сильнее, чем у ацетилхолина). Автор связывает эффекты ацетилхолина и прозерина с действием на подкорковые ядра: хвостатое и медиальное. Аналогичные наблюдения были проведены Пальмером (Palmer, 1959) на овцах. При введении животным в боковой желудочек мозга эзерина автор наблюдал у них повышение возбудимости, расстройство координации движений, паралич мышц, иннервируемых некоторыми черепными нервами, повышение ректальной температуры. Кроме того, отмечались расстройства дыхания. Эффект был кратковременным, и уже через 30—40 мин все функции восстанавливались. Те же явления вызывал и ДФФ, но его эффект был более продолжительным и проходил только через 5 ч. Этот пример является хорошей иллюстрацией продолжительности действия у обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы.

Антагонистические отношения между ФОС и атропином в их действии на центральную нервную систему были изучены в опытах с введением веществ непосредственно в третий желудочек мозга ненаркотизированных собак — через хронически вживленную канюлю (Eder, 1962):

ТЭПФ в дозе 100  $\gamma$  вызывал беспокойство, тремор, страх, а с увеличением дозы до 250—500  $\gamma$  — рвоту, саливацию, подергивания мышц головы и повторные эпилептиформные припадки. Внутривентрикулярное введение атропина и в меньшей степени реактиваторов холинэстеразы предупреждало и частично снимало явления, вызываемые внутривентрикулярным введением ТЭПФ.

Инъекция комбинации ацетилхолина и эзерина в гипоталамус кошки вызывает ярость (Eglin, 1953), а у крыс — повышение поглощения воды (Grossman, 1960). Микроинъекция эзерина с ацетилхолином в *cingul. posterior* у кошек вызывает изменения в половом поведении (MacLean, 1955). Введение тех же веществ в гиппокамп вызывает явления псевдокатонии (MacLean, 1957b).

Для понимания сложных и далеко еще не изученных физиологических механизмов действия антихолинэстеразных веществ на центральную нервную систему большое значение имеют работы с местным нанесением ацетилхолина и антихолинэстераз-

ных в  
мозга.

Эзе

1%-н

ной эле

psey, 1

тивопо

В о

совмес

(Kristi

ности

но, на

стимул

На

двигат

следует

ответст

оказыв

лин ок

роны к

низмы

Мин

эстера

мы нер

их кли

зерин

миасте

мечате

нения

период

Это св

логии

и расп

тур. Та

ронной

тихоли

ществ

меньш

зовани

ниях. К

ческой

больш



ных веществ на интактную и изолированную кору головного мозга.

Эзерин и прозерин при нанесении на кору кошек в виде 1%-ных растворов вызывают преходящую депрессию спонтанной электрической активности (Miller et al., 1940; Chatfield, Dempsey, 1942). В больших концентрациях эффект становился противоположным (Chatfield и др., 1954).

В опытах на изолированной коре ацетилхолин и эзерин при совместном применении увеличивали амплитуду потенциалов (Kristiansen, Courtis, 1949) и вызывали судорожный тип активности (Infantillina, 1955); если же препараты вводились отдельно, наблюдалась депрессия корковых ответов на электрическую стимуляцию.

На основании приведенных данных в последнее время выдвигается гипотеза, согласно которой в коре головного мозга следует различать два слоя, один из которых (поверхностный) ответствен за возбудительный процесс, а другой (глубокий) оказывает на него тормозное влияние. Полагают, что ацетилхолин оказывает влияние как на тормозные, так и на другие нейроны коры, в то время как атропин блокирует тормозные механизмы (Chatfield, Lord, 1955).

### КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ

Многогранность фармакологического действия антихолинэстеразных веществ на центральные и периферические механизмы нервной регуляции таит в себе большие возможности для их клинического использования. И действительно, эзерин и прозерин давно и с успехом применяются при таких состояниях, как миастения, глаукома, послеоперационная атония кишечника. Примечательно, что эти традиционные рамки клинического применения антихолинэстеразных веществ, особенно в послевоенный период, расширяются и получают большее научное обоснование. Это связано с последними достижениями физиологии и фармакологии в области изучения механизма холинергической передачи и распространением этого механизма на большее число структур. Так, установление роли ацетилхолина в центральной межнейронной передаче дало толчок к испытанию лечебных свойств антихолинэстеразных (как, впрочем, и других холинергических) веществ при ряде заболеваний центральной нервной системы. Не меньшее значение имел и большой опыт клиницистов по использованию антихолинэстеразных веществ при различных заболеваниях. Наконец, важным фактором явился прогресс фармацевтической химии, благодаря которому стал возможным синтез большого числа новых антихолинэстеразных веществ.



Сколько-нибудь подробное изложение обширных материалов по клиническому применению антихолинэстеразных веществ потребовало бы написания специальной книги. Частично эти материалы уже нашли отражение в монографиях и обзорах (Н. Н. Аносов и М. А. Розин, 1956; Н. И. Гращенко, 1946, 1948; Г. Н. Сорохтин и О. П. Минут-Сорохтина, 1946; Г. Н. Сорохтин, 1961; М. Я. Михельсон и сотр., 1957), частично они суммированы в руководствах по фармакологии и фармакотерапии (С. В. Аничков, М. Л. Беленький, 1956; В. В. Закусов, 1960; Н. В. Лазарев, 1962; М. Д. Машковский, 1962; Goodman, Gilman, 1955; Sollman, 1957; Drill, 1958; Krantz, Carr, 1958).

В рамках настоящей книги могли быть представлены лишь обобщенные данные по этому вопросу.

Антихолинэстеразные препараты нашли применение в невропатологии (лечение миастении, парезов и параличей, невритов и др. заболеваний), офтальмологии (антиглаукоматозные средства), хирургии (борьба с атонией кишечника, антикурарное действие), акушерстве и гинекологии (для родоускорения). В последнее время предпринимаются попытки применения некоторых антихолинэстеразных фосфорорганических препаратов в химиотерапии. Каждый из перечисленных видов применения необходимо охарактеризовать более подробно.

## ПРИМЕНЕНИЕ В НЕВРОПАТОЛОГИИ

### ЛЕЧЕНИЕ МИАСТЕНИИ

Изучение роли ацетилхолина в нервно-мышечной передаче и установление стимулирующего влияния антихолинэстеразных веществ на сократительную деятельность мускулатуры (см. стр. 205) было незамедлительно использовано клиникой.

Первые же попытки применения эзерина и прозерина для восстановления мышечной силы у больных миастенией оказались успешными (Walker, 1934, 1935). С тех пор в области лечения миастении накоплен большой клинический материал (сводку обширной литературы см., напр., у Н. Н. Аносова и М. А. Розина, 1956, а также в обзорах Десмедта — Desmedt, 1956, Гроба и др. — Grob et al., 1956, Grob, 1963, Шваба и др. — Schwab et al., 1957).

В Советском Союзе прозерин для лечения миастении применяется с 40-х годов (Л. А. Лоцман и Л. Б. Перельман, 1940; Н. И. Гращенко, 1946).

Согласно современным представлениям, возникновение миастении связано не с недостатком ацетилхолина в нервных окончаниях (из-за избытка холинэстеразы), как полагали раньше, а со снижением чувствительности концевых мышечных пластинок к нормальным количествам медиатора, вследствие чего для



возникновения мышечного сокращения требуется большее количество ацетилхолина (Paton, Zaimis, 1952; Crob, Johns, Harvey, 1956). Накопление ацетилхолина в синапсе при воздействии ингибиторов холинэстеразы приводит к повышению силы мышечных сокращений. Мнение о том, что миастения возникает вследствие циркуляции в крови какого-то курареподобного вещества (Möller, 1954), поступающего из тимуса (Wilson A., Wilson H., 1956), не нашло прочного экспериментального подтверждения.

Эзерин широко используется для лечения миастении. Наряду с этим предпринимаются попытки изыскания более эффективных и менее токсичных препаратов. По данным литературы, из числа обратимых ингибиторов холинэстеразы наибольшего внимания заслуживают пиридостигмин (местинон) и некоторые бис-четвертичные соединения, из которых особенное распространение за рубежом получил амбеноний — мителаза (Desmedt, 1956).

Обнадеживающие результаты были получены при лечении миастении следующими обратимыми ингибиторами холинэстеразы: пиридостигмином (Halcut, 1955), амбенонием (Desmedt, 1956), мисюраном или Win-8077 (Ravina, 1955; Schwab et al., 1955), препаратом ВС-40 гексаметилен-бис-(N-метилкарбаминил-м-триметиламмоний) (Patewsky et al., 1955). Согласно недавно опубликованным данным Б. А. Медведева (1962), Л. Б. Перельмана и др. (1962), положительной оценки заслуживает также новый советский препарат оксазил.

Некоторые из этих веществ действуют сильнее и длительнее прозерина и местинона (например, ВС-40 и его аналоги), но их применение ввиду значительной токсичности требует осторожности (Patewsky, 1959).

Поскольку действие обратимых ингибиторов непродолжительно и сопровождается лишь временным ослаблением симптомов миастении, естественно было ожидать, что с появлением не-обратимых ингибиторов этот недостаток будет ликвидирован. Детальное клиническое изучение действия ДФФ и ТЭПФ на мышечную функцию проведено Гарвеем и сотрудниками. Согласно данным этих авторов, внутриартериальное введение 1,5 мг ДФФ здоровому человеку вызывает резко выраженную мышечную слабость и множество спонтанных фибрилляций. Этот эффект достигает максимума через 30—40 мин и длится до 5 дней. Увеличение дозы вызывает выраженный парез. Внутриартериальное введение кураре конкурентно препятствует нервно-мышечным эффектам ДФФ. У миастеников ДФФ вызывает сильное местное возрастание мышечной силы и нормализует миограмму, при этом мышечных подергиваний не отмечается. Предварительным введением прозерина можно предупредить отмеченный эффект ДФФ, что свидетельствует об антихолинэстеразном механизме действия небольших доз ДФФ на поперечнополосатую мускулатуру. Следует отметить, что реакция нервно-мышечных



приборов у здоровых людей и миастеников неодинакова. ТЭПФ, вызывая у здорового человека внезапное снижение мышечной силы (потеря способности сохранять тонус), у миастеников, наоборот, приводит к постепенному ее нарастанию (рис. 35). Это связано с неодинаковой чувствительностью здорового и патологически измененного нервно-мышечного прибора к ацетилхолину.

Клинические наблюдения не выявили желательной избирательности в действии ДФФ и ТЭПФ на нервно-мышечные соединения. Это было видно из того, что при подкожном введении таких препаратов у больных миастенией отмечались выраженные побочные явления со стороны центральной нервной системы и других органов.

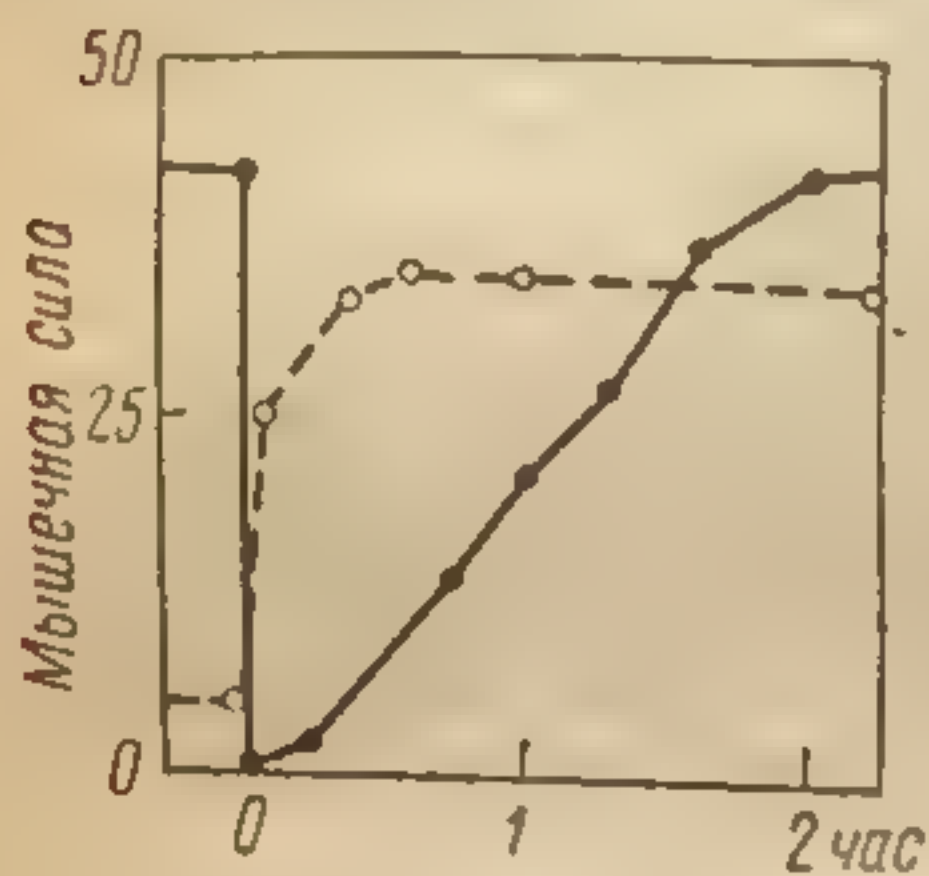


Рис. 35. Влияние ТЭПФ (внутриартериальное введение) на мышечную силу руки здорового человека (сплошная линия) и миастеника (пунктирная линия) (Grob a. Narveu, 1958).

С синтезом октаметила эти недостатки в значительной мере были преодолены. Согласно данным Фроули и др. (Frawley et al., 1952), при угнетении октаметилом холинэстеразы в мышцах на 93% фермент в мозгу оставался почти неизменным. Это связано с тем, что октаметил (вернее, его активный метаболит, образующийся в организме при его превращении) не проникает через гематоэнцефалический барьер. Клиническое испытание октаметила показало его высокую эффективность и отсутствие побочных симптомов со стороны центральной

нервной системы (Schulman, Rider, 1953; Page et al., 1953), в связи с чем он стал рассматриваться как чуть ли не идеальное антимиастеническое средство (Agranow et al., 1957).

Однако применение октаметила, по-видимому, достаточно эффективно только в легких и умеренных по тяжести случаях. У пациентов с прогрессирующим тяжелым течением заболевания оно может быть даже противопоказано.

Поскольку октаметил отличается от других ФОС большей избирательностью в действии на периферическую нервную систему, то в качестве средств для лечения миастении заслуживают внимания соединения типа фосфорилхолинов, однако данных об их клиническом применении в литературе пока нет.

#### ЛЕЧЕНИЕ ДРУГИХ НЕРВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Одновременно с применением для лечения миастении прозерин был испытан при ряде других заболеваний нервной системы (прогрессивная мышечная дистрофия, полиневриты, параличи различной этиологии, в частности после полиомиелита и др.). Подробную сводку этих работ можно найти у Н. Н. Ано-



сова и М. А. Розина (1956). Особенно следует отметить большой вклад в эту проблему отечественных ученых, много сделавших для научного обоснования прозеринового метода терапии и его внедрения в широкую медицинскую практику (Н. И. Гращенков, Г. Н. Сорохтин и сотр.).

Эффективность прозерина и эзерина при различных нервных заболеваниях неодинакова. В связи с этим представляют интерес данные Н. Н. Аносова (табл. 28) о применении этих препаратов при самых различных заболеваниях нервной системы, включая травматические повреждения.

Таблица 28

Результаты лечения прозеринем и эзеринем различных заболеваний нервной системы (по Н. Н. Аносову, 1956)

Локализация патологического процесса	Диагноз	Прозерин			Эзерин		
		всего наблюдений	улучшение	без изменения	всего наблюдений	улучшение	без изменения
Нервное волокно	Прогрессивная мышечная дистрофия	4	2	2	8	6	2
	Травматические повреждения стволов конечности	73	41	32	92	63	29
	Невриты	44	38	4	70	68	2
Передние рога	Полеомиелит	19	4	15	37	21	16
Задние рога	Сирингомиелия	32	15	17	69	41	28
	Миелит	14	7	7	16	10	6
Проводящие пути спинного мозга	Последствия травмы спинного мозга	35	22	13	54	30	24
Кора и проводящие пути	Последствия ушиба головного мозга	85	50	35	31	20	11
Пирамидные пути	Рассеянный склероз	7	3	4	8	5	3

Из таблицы видно, что прозерин и эзерин оказались эффективными при нарушениях функционирования как периферических, так и центральных отделов нервной системы. Основным лечебный эффект препаратов сводится к восстановлению функции отдельных нервных структур. Клинически это сказывается в восстановлении (частичном, реже полном) двигательной функции, чувствительности, координационных отношений. Наиболее дей-



ственны эти средства в восстановительный период заболевания, при стойких остаточных явлениях они менее эффективны.

Согласно данным отечественных и иностранных авторов, хорошим лечебным действием при ряде нервных заболеваний обладает галантамин (Н. К. Боголепов, 1953; С. С. Левин, 1953; Н. А. Шенк и др., 1956; Di Grutolla и др., 1955, и др.) и нивалин (Т. У. СклЯрова, 1962; Pernow, 1961; Rewelli, Grasso, 1962, и др.). Галантамин и нивалин по своей антихолинэстеразной активности несколько уступают прозерину, но имеют перед ним иные преимущества, а именно — обладают большей терапевтической широтой и преобладанием в действии на центральную нервную систему стимулирующих эффектов (Д. М. Пасков, 1958). Хорошие результаты при лечении антихолинэстеразными веществами центральных и периферических параличей наблюдал Лагор (Lagor, 1955).

В последнее время для лечения периферических и центральных параличей стали пробовать применять и фосфорорганические соединения. В 1951 г. М. Б. Эйдинова и Э. А. Эдельштейн сообщили о первых обнадеживающих результатах клинического испытания фосфакола. М. М. Ленкевич (1956) в опытах на животных, у которых вызывалось травматическое повреждение нерва, наблюдал после повторного введения ТЭПФ значительное ускорение восстановления тонуса дистальных мышц. М. М. Шарипов (1957) рекомендовал использовать фосфакол в клинике.

Согласно данным В. Н. Асекритовой (1962), пирофос способствует более ускоренному восстановлению двигательных функций при невритах лицевого и лучевого нервов, как предполагает автор, за счет восстановления нарушенного медиаторного обмена.

На основании имеющихся немногочисленных клинических материалов в настоящее время нельзя сделать выводы о каких-либо преимуществах фосфорорганических антихолинэстеразных соединений перед эзеринем, прозеринем и галантамином (нивалином). Можно, однако, думать, что применение фосфорорганических веществ в нервной клинике неизбежно встретит ограничения из-за большей токсичности и предпочтение будет отдано хотя и не столь мощным ингибиторам холинэстеразы, но зато более безопасным. В этом смысле наиболее перспективным, по-видимому, является галантамин (нивалин).

Механизм лечебного эффекта антихолинэстеразных веществ при частичном или полном выпадении функции периферических нервов, проводящих путей спинного мозга и других нервных структур базируется на данных, изложенных в соответствующих главах. Поскольку малые дозы антихолинэстеразных веществ оказывают стимулирующее влияние на нервное проведение во всех тех структурах, где оно осуществляется при помощи холинэргических механизмов, постольку от применения этих веществ

при локализации про-  
однако, одно из  
заболеваний приме-  
вовсе не структур-  
ных единиц путей. В  
антихолинэстераз-  
своеобразную тиче-  
ской

При рефлекторно обра-  
ощающихся к обыч-  
ным, приводит к  
системе, чрезвыча-  
зному этим обсто-  
ятельства и  
ухудшению централь-  
ного, что воз-  
можной к  
никает во  
при прозе-  
особенно  
эффектах н  
с этой то-

#### ПРИМЕНЕНИЕ

Способ-  
тельные ф-  
дупрежде  
До недав-  
тельно эзе-  
зуется га-  
алантами-  
отметили  
операцион-  
лением ф-  
таны при



при локальном или распространенном выпадении или ослаблении проведения можно ожидать лечебного действия. Последнее, однако, нельзя рассматривать как каузальную терапию, ибо ни одно из антихолинэстеразных веществ не действует на причину заболевания. Более того, нередко положительный эффект при применении антихолинэстеразных веществ может наблюдаться вовсе не от того, что восстановлена проводимость в пораженной структуре, а вследствие усиления функции смежных структурных единиц и включения в процесс первого проведения новых путей. В этом смысле восстановительный эффект при лечении антихолинэстеразными веществами можно рассматривать как своеобразную компенсаторную реакцию нервной системы, вызванную усилением процессов, связанных с гуморальной синаптической передачей.

При рассмотрении влияния антихолинэстеразных веществ на рефлекторную деятельность спинного мозга (см. стр. 220) мы обращали внимание на то, что действие несколько больших, чем обычные, дозировок этих веществ вместо усиления рефлексов приводит к их торможению. Эта пессимальная реакция нервной системы, связанная с чрезмерным накоплением ацетилхолина, чрезвычайно нежелательна с точки зрения клинического использования антихолинэстеразных веществ. Может быть, именно с этим обстоятельством связана недостаточная эффективность прозерина и эзерина при некоторых нервных заболеваниях, а также ухудшение процесса в отдельных случаях. При сопоставлении центральных эффектов эзерина и прозерина было давно замечено, что у прозерина значительно больше выражен именно тормозной компонент в действии на спинномозговые рефлексы. Возникает вопрос: не связано ли большее количество осложнений при прозериновой терапии именно с этой, не всегда учитываемой особенностью его действия? Преобладание в центральных эффектах нивалина (галантамина), стимулирующего компонента, с этой точки зрения должно оцениваться положительно.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ АТОНИИ КИШЕЧНИКА И МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Способность антихолинэстеразных веществ усиливать двигательные функции кишечника (см. стр. 166) используется для предупреждения или лечения послеоперационной атонии кишечника. До недавнего времени в этих целях применялся почти исключительно эзерин и прозерин. В последнее время с успехом используется галантамин (возможно также применение йодметилата галантамина) или нивалин. Феррара и др. (Ferrara et al., 1961) отметили высокую эффективность нивалина у больных с послеоперационной атонией и отсутствие побочных эффектов. С появлением фосфорорганических соединений они тоже были испытаны при послеоперационной непроходимости. По данным Квил-



лиама (Quilliam, 1947), ДФФ оказался более эффективным средством, чем прозерин или питуинрин. Р. А. Вяселов (1961) сообщил о положительных результатах лечения нибуфином больных в послеоперационном периоде с парезами кишечника. Нибуфин повышал тонус кишечника, что приводило к появлению перистальтики и стула. Эффект развивался постепенно, побочного действия не отмечено.

Антихолинэстеразные вещества с успехом могут быть применены в целях повышения тонуса мочевого пузыря при его атонии. Наряду с хорошо зарекомендовавшими себя в этом отношении эзерин и прозерин были предприняты попытки использовать для этих целей новые антихолинэстеразные вещества, среди которых следует упомянуть бромид бензпирина, который превосходит по своей эффективности эзерин и к тому же является менее токсичным (Weinstein, Roberts, 1953).

#### ПРИМЕНЕНИЕ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Среди методов лечения глаукомы основное место принадлежит веществам, вызывающим миоз. Длительное время для этих целей использовались преимущественно пилокарпин и физостигмин (Duprhy, 1949; Scheie, 1949), однако в дальнейшем были испытаны другие миотические средства, в особенности из группы антихолинэстеразных веществ. Снижение внутриглазного давления под влиянием антихолинэстеразных веществ (так же как и пилокарпина) обусловлено сокращением сфинктера зрачка, которое приводит к расширению фонтановых пространств, увеличению оттока внутриглазной жидкости из передней камеры глаза в шлеммов канал и тем самым к падению внутриглазного давления. Некоторые авторы считают, что определенное значение в этом эффекте может иметь расширение сосудов глаза, которое, однако, не воспроизводится в условиях изолированного воздействия на сосуды глаза (Б. М. Эйдельман, 1952).

Подробные сведения о влиянии фармакологических веществ на внутриглазное давление можно встретить в обзоре Гранта (Grant, 1955), однако он не включает работы советских авторов и, кроме того, приведенные в обзоре сведения несколько устарели.

Из числа антихолинэстеразных средств, испытанных с целью снижения внутриглазного давления, необходимо упомянуть прозерин и ряд фосфорорганических эфиров. Эффективность прозерина, по-видимому, не во всех случаях является удовлетворительной, в особенности при острых приступах глаукомы и абсолютной глаукоме (Н. Е. Волокитченко, 1959). Возможно, это связано с недостаточной проницаемостью для прозерина гистогематического барьера. Это доказывается тем, что при введении непосредственно в переднюю камеру глаза прозерин был

даже  
как пр  
обрат  
ченые  
et al.,  
1952).

Бол  
в обла

в качес  
бенност  
казанск  
ших дл  
тивных  
Дан  
в табл.  
Пре  
и др., п  
выраже  
что фос  
и в тех  
По  
тиофосф  
в далск  
ления п  
начальн  
центный



даже эффективнее эзерина (Campell, Smith, 1962), в то время как при инстилляции в конъюнктивальный мешок наблюдаются обратные отношения. Обнадеживающие результаты были получены с ДФФ (П. Е. Тихомиров и О. А. Троицкая, 1952; Leopold et al., 1946, 1948, 1953) и ТЭПФ (Grant, 1948; Likki, Tomarelli, 1952).

Большого внимания заслуживают работы советских авторов в области исследования новых фосфорорганических соединений

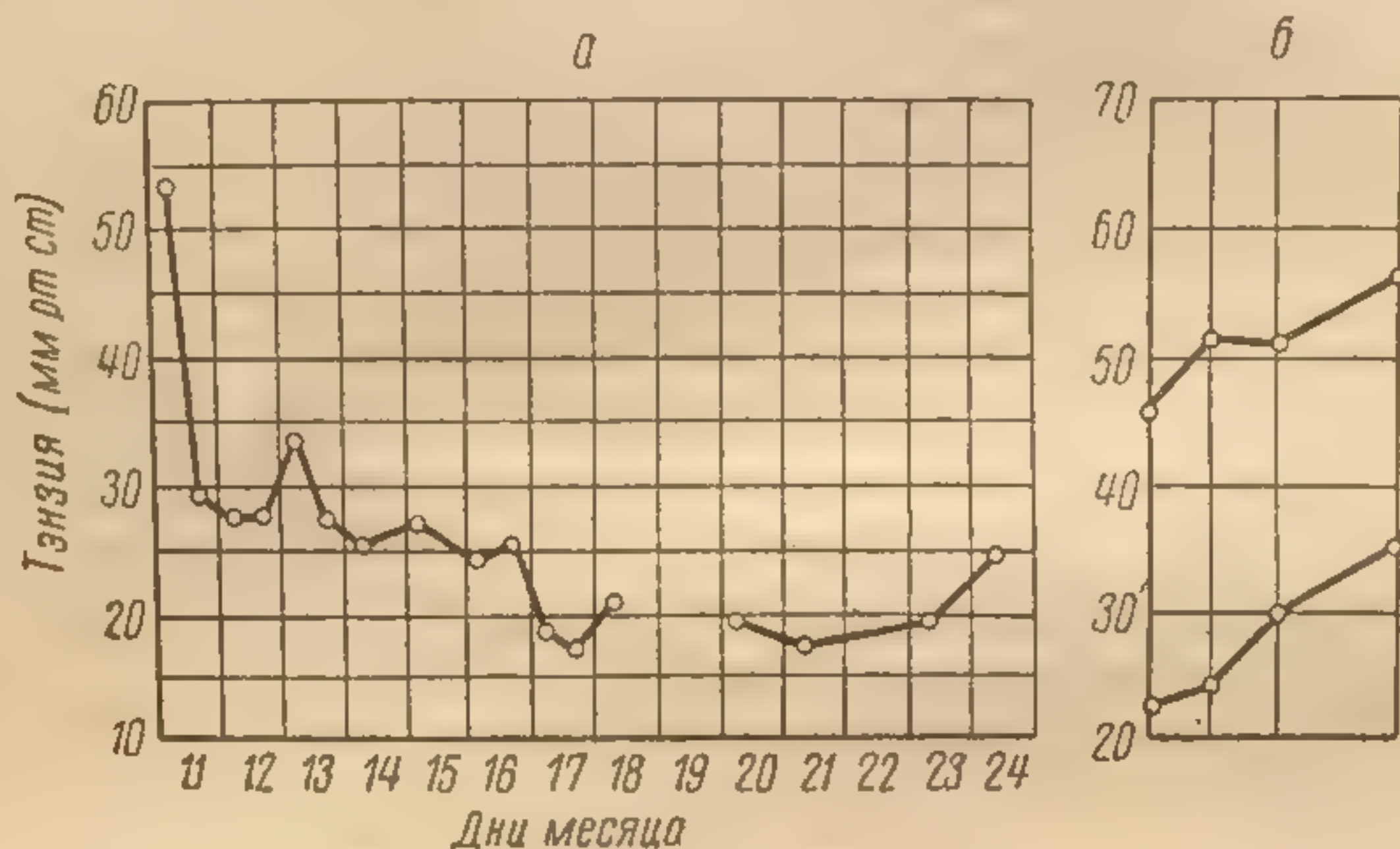


Рис. 36. Нормализация внутриглазного давления правого глаза (а) и нормализация эластотонметрической кривой (б) (Г. Н. Тиминская, 1962).

Тиофосфен вводился в разведении 1:2000 два раза в сутки.

в качестве средств, снижающих внутриглазное давление. В особенности перспективными в этом направлении являются работы казанских химиков, фармакологов и клиницистов, предложивших для медицинской практики несколько новых высокоэффективных фосфорорганических препаратов.

Данные об эффективности ФОС при глаукоме суммированы в табл. 29.

Преимущества таких препаратов, как армин, нибуфин, дитио и др., перед пилокарпином и прозерином заключаются в более выраженном и продолжительном эффекте. Важно также и то, что фосфорорганические средства оказывают лечебный эффект и в тех случаях, когда пилокарпин мало эффективен.

По данным Г. Н. Тиминской (1962), особенно эффективен тиофосфен (рис. 36). После применения этого препарата даже в далеко зашедших случаях нормализация внутриглазного давления произошла почти у половины больных, не говоря уже о начальных формах, при лечении которых был получен стопроцентный эффект.



Характеристика лечебной эффективности ФОС при глаукоме  
(по литературным данным)

Препарат и его строение	Результаты клинического наблюдения	Автор
<p>ФОСФАКОЛ</p> $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \diagup \\ \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2 \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	<p>Наблюдение за 36 больными. Рекомендация совместного назначения пилокарпина и фосфакола</p> <p>Наблюдение за 54 больными. Наиболее эффективен препарат в растворе 1:7,5 г. Рекомендуется в качестве заменителя пилокарпина и эзерина</p> <p>Назначение препарата 25 больным показало, что препарат (1:5000) эффективно снижает внутриглазное давление (ВГД), уменьшает размеры слепого пятна и вызывает сильный миоз. Длительное применение нормализует ВГД даже у тех больных, у которых применение других средств было не эффективно. У ряда больных были побочные явления (сильные боли в глазах и головные боли)</p> <p>Применение препарата в 0,01—0,03%-ных растворах 1—2 раза в день у 19 больных с тяжелыми формами глаукомы привело к нормализации ВГД только в 3 случаях. У 11 больных отмечены тяжелые побочные явления, потребовавшие отмены препарата</p> <p>При лечении 100 больных установлено, что длительное применение препарата в разведении 1:5000 дает (12 больных) осложнение в виде пигментных кист, расположенных по зрачковому краю</p> <p>Из 85 больных у 49 получен положительный эффект (расширение поля зрения) при инстилляции раствора 1:5000. Побочные явления в 10% случаев</p>	<p>А. В. Мещерякова, 1954</p> <p>Г. Ф. Анненкова, 1955</p> <p>Г. Н. Тиминская, 1956</p> <p>М. Т. Курева, 1957</p> <p>Д. И. Артемьев, 1960</p>



Препарат и его строение	Результаты клинического наблюдения	Автор
<p>АРМИН</p> $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5-\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \quad \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \quad \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	<p>При комбинированном применении фосфакола и пилокарпина у 56 больных тяжелой формой глаукомы в среднем в половине случаев получен хороший результат. Отмечено побочное действие</p> <p>На основании наблюдения за 39 больными делается вывод, что армин (0,005%-ный раствор) активнее, чем фосфакол (0,02%). Побочные явления редки, но у армина чаще, чем у фосфакола</p> <p>По своему действию превосходит пилокарпин. Компенсация внутриглазного давления наступила у 25 больных из 53, у 16 была субкомпенсация, у 9 эффекта не было и у 3 отмечено незначительное повышение ВГД. Побочные явления (боли в глазном яблоке)</p> <p>Применен в концентрации 1:10000 25 больным с положительным эффектом у 22.</p> <p>Компенсация внутриглазного давления наступила у 14 больных. Препарат по активности превосходит все применяемые средства, за исключением фосарбина</p> <p>Положительный лечебный эффект получен у 20 из 22 больных (преимущественно с конгестивной формой). В концентрации 1:10 000—1:20 000 армин оказывает действие более сильное, чем 5%-ный раствор пилокарпина и 0,25%-ный раствор эзерина</p>	<p>А. В. Трошкова, 1959</p> <p>А. П. Весенин, 1957, 1958</p> <p>Д. Х. Юсупова, 1958</p> <p>Л. Л. Устищенко, 1958</p> <p>С. В. Розовская, 1959</p>
<p>НИБУФИН</p> $\begin{array}{c} (\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \quad \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	<p>При введении в здоровый глаз раствора 1:3000 продолжительность миоза 25—30 ч</p> <p>При глаукоме миоз держится только 2—8 ч. Компенсация ВГД отмечена в 32,5% случаев, субкомпенсация — в 28%. Отмечено болеутоляющее действие и отсутствие побочных эффектов</p>	<p>В. М. Краснова и И. В. Заиконникова, 1961; В. М. Краснова, 1962</p>



Препарат и его строение	Результаты клинического наблюдения	Автор
<p>ФОСАРБИН (ПИРОФОС)</p> $  \begin{array}{c}  \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{OC}_2\text{H}_5 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{P} - \text{O} - \text{P} \\  \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\  \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{S} \quad \text{O} \quad \text{OC}_2\text{H}_5  \end{array}  $	<p>На основании наблюдений за 35 больными сделан вывод о том, что нибуфин по лечебной эффективности уступает фосфаколу, фосарбину и армину</p>	В. Я. Чернявский, 1961
	<p>В концентрации 1:5000—1:10 000 (масляные растворы) был эффективнее пилокарпина, эзерина, карбохолина, бензамона и фурамона. Побочного действия не отмечено</p>	Л. Л. Устименко, 1956
	<p>При сравнении с армином оказался столь же эффективным (оба препарата исследованы в концентрации 1:10 000)</p>	Л. Л. Устименко, 1958
	<p>Проведено лечение 66 больных с различными стадиями глаукомы. В концентрации 1:10 000—1:5000 был эффективен у большинства больных. По активности превосходил пилокарпин, фосфакол и др. миотики</p>	Р. Ф. Адышин-Заде, 1960
	<p>У 35 больных лучший результат получен при простой глаукоме. Нормализация ВГД в начальной стадии отмечена в 31,6%, в развитой — в 18,2%, в далеко зашедшей — в 25% случаев</p>	Н. Б. Панина, 1960
	<p>На основании большого количества наблюдений препарат рекомендуется для лечения различных форм глаукомы, особенно в комбинации с другими миотиками</p>	К. Károly, 1961
	<p>Наблюдения за 40 больными первичной глаукомой. Закапывался масляный 0,1—0,25%-ный раствор 2—4 раза в день. Наиболее эффективен препарат при простой форме глаукомы. Зрение улучшилось у 20 больных. Препарат не вызывает побочных явлений и в некоторых случаях эффективнее пилокарпина</p>	З. М. Осипова, 1962



Препарат и его строение	Результаты клинического наблюдения	Автор
ТИОФОСФЕН $(C_2H_5O)_2P-OCH_2COOC_2H_5$ $\parallel$ S	Под наблюдением находилось 50 больных. Препарат применялся в концентрациях 1:2000—1:5000. Нормализация ВГД произошла у 100% больных в начальной, у 60% развитой и 45% больных далеко зашедшей глаукомой. 4 улучшения остроты зрения отмечено на 15 глазах. Побочных явлений не было	Г. Н. Тиминская, 1962

Заслуживает также внимания опыт зарубежных офтальмологов по изучению противоглаукоматозной активности нового мощного антихолинэстеразного препарата — бромистого демекария (декаметиллен-бис-N-метилкарбаминоил-м-триметиламмонийфенол, ВС-48, тосмилен); особенно подчеркивается продолжительность действия препарата (3—4 дня) и его высокая активность (Gittler, 1959; Drance, 1959). Хервен (Hörven, 1962) после применения этого препарата у больных глаукомой наблюдал снижение внутриглазного давления даже в тех случаях, когда ни пилокарпин, ни диамокс не были эффективны.

Согласно наблюдениям Маурицио (Mauroicio, 1960), перспективным является также фосфорорганический антихолинэстеразный препарат коралокс (диэтил-о-3-хлор-4-метил-7-кумаринилфосфотрионат), близкий по строению к коралю и обладающий продолжительным миотическим действием (до 15 ч); однако данные о его лечебной эффективности отсутствуют.

#### ПРИМЕНЕНИЕ В АКУШЕРСКОЙ ПРАКТИКЕ

Стимулирующее влияние на сократительную деятельность матки прозерина, армина и некоторых других антихолинэстеразных веществ, принадлежащих как к обратимым, так и к необратимым ингибиторам холинэстеразы, используется в акушерской практике. По идее и при участии М. Я. Михельсона у нас в стране разработан прозериновый метод родоускорения (М. Я. Михельсон, 1952; З. А. Дроздова, 1951; А. В. Савшинская, 1951; В. А. Пермская, 1955). Научное обоснование этого метода исходит из представлений о существовании центральных и периферических холинергических механизмов, регулирующих и осуществляющих деятельность матки, причем доказано, что в период, предшествующий родам, эти механизмы имеют особое значение.



Прозериновый метод родоускорения высоко эффективен только при слабости родовой деятельности. Если же родовая деятельность совершенно отсутствует, то холинергические структуры, участвующие в родовом акте, не тонизированы и прозерин оказывается неэффективным (М. Я. Михельсон). Эзерин, предложенный для ускорения родов А. И. Петченко в 1949 г., большого распространения не получил.

Обстоятельные данные, подытоживающие клинический опыт применения прозерина, можно встретить у З. А. Дроздовой

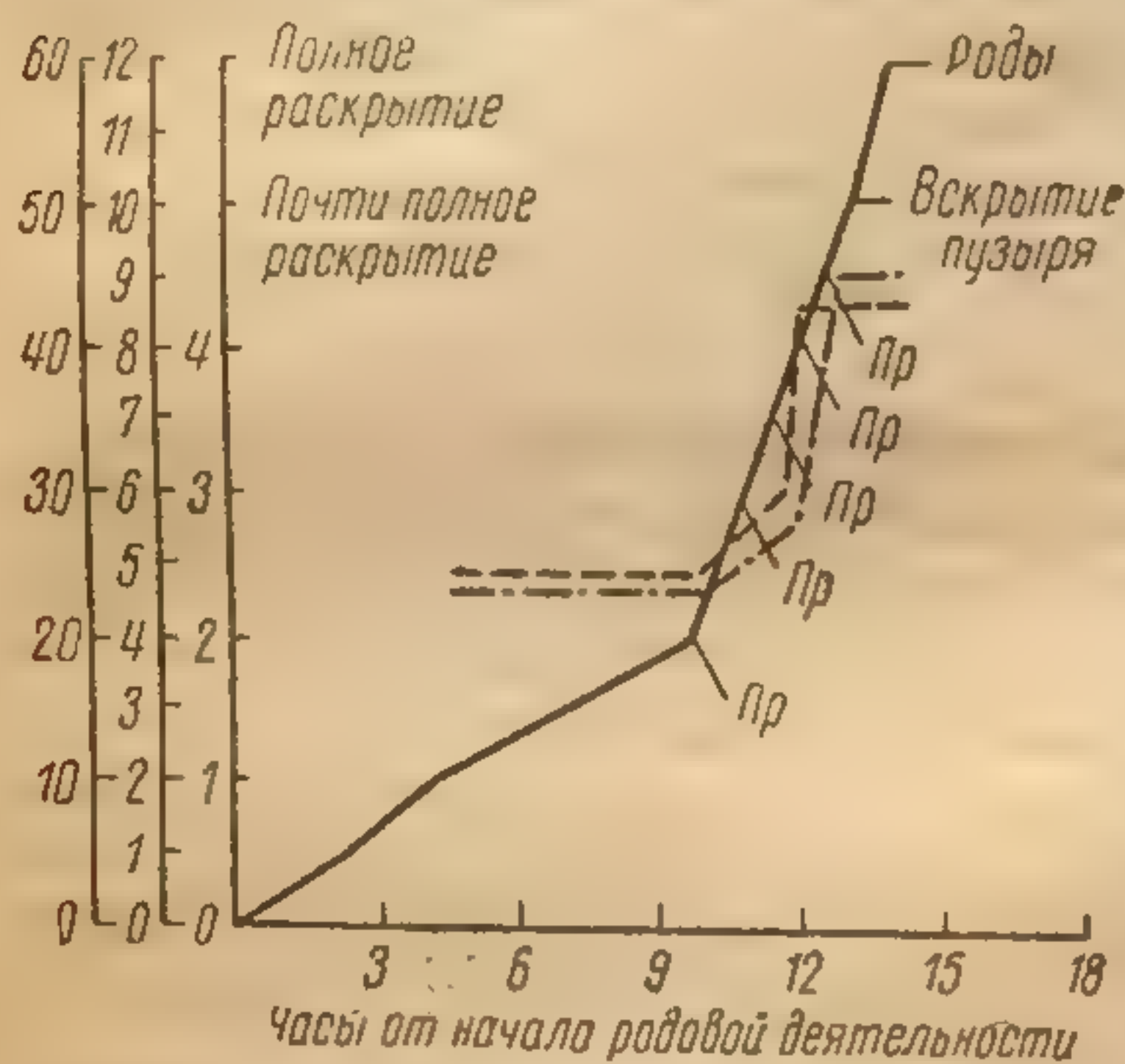


Рис. 37. Стимуляция родовой деятельности прозеринем (Пр) у первородящей (В. А. Пермская, 1955).

Сплошная линия — раскрытие шейки (в пальцах); прерывистая — число схваток за 30 мин; пунктирная — длительность схваток в сек.

Прозерин показан главным образом при слабой родовой деятельности (рис. 37), однако его применение дает хорошие результаты и при нормальном протекании родов (ускорение родов), а также в послеродовом периоде (уменьшение его продолжительности и кровопотерь). Особого внимания заслуживает применение прозерина с целью предотвращения ослабления родовой деятельности при применении обезболивающих средств, что послужило обоснованием для совместного применения прозерина и обезболивающих средств (В. Г. Бутомо, 1952; Т. А. Кучеренко, 1952; А. М. Петров-Маслаков, 1952; Ф. Э. Варшавская, 1954; Ш. В. Микеладзе, 1954). Допустимость увеличения лечебной дозы прозерина до 15 мг (для этих целей прозерин назначается совместно с атропином, который, снижая его побочный эффект, не влияет на лечебное действие) расширяет возможности эффективного применения прозерина.

Небезынтересно также сообщение Сулливана (Sullivan, 1958), согласно которому прозерин облегчает изжогу при беременности в 90% случаев. Местинон в этом отношении был неэффективен. Автор объясняет это слабостью мускариноподобного

(1957). Анализ показывает высокую эффективность прозеринового метода родоускорения (по данным ленинградских клиник, 80—85% положительных результатов).

Не менее благоприятные результаты наблюдали при применении прозерина И. И. Богоров (1952), Ш. В. Микеладзе (1954), В. Г. Бутомо (1952), А. М. Петров-Маслаков (1952), П. А. Белошапко и А. М. Фой (1954).

Прозерин показан главным образом при слабой родовой деятельности (рис. 37), однако его применение дает хорошие результаты и при нормальном протекании родов (ускорение ро-



действия местинона и полагает, что эффективность прозерина связана именно с этим эффектом.

В последнее время в целях родоускорения были испытаны некоторые фосфорорганические препараты: армин (Л. В. Чугунова, 1959а; Е. А. Беляева, 1962; А. Л. Чайковская, 1962) и препараты 131 и 132, представляющие собой алкиловые эфиры диэтил и дипропил фосфиновых кислот (Н. А. Корчагина, 1962).

По наблюдениям Л. В. Чугуновой, армин (1 мл 0,01%-ного раствора подкожно) дал благоприятный эффект в 88% случаев, особенно показано его применение в случае несвоевременного отхождения вод. Однако при целых водах и при переносенной беременности, а также при мертвом плоде армин оказался неэффективным. Автор указывает на отсутствие побочных эффектов при применении армина.

Отсутствие в литературе сравнительных данных об эффективности прозерина и армина не позволяет высказаться в пользу одного из них.

Одним из возможных показаний для применения антихолинэстеразных веществ в акушерской практике является, по-видимому, вторичная аменорея. Согласно данным Эльснера (Elsner, 1955), при этом патологическом состоянии эффективны прозерин и некоторые гомологи октаметилена-бис-(карбаминоил-м-триметиламмоний фенола) — препараты ВС-40, ВС-47 и ВС-48.

#### ДРУГИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Возможности клинического использования антихолинэстеразных веществ не ограничиваются вышеперечисленными заболеваниями. Успехи в области синтеза и фармакологии антихолинэстеразных веществ и прогресс нейрофизиологии и нейрохимии послужили стимулом к тому, чтобы расширить традиционные рамки клинического применения этих ценных лекарственных препаратов. В самом деле, если сопоставить широкий фармакологический спектр действия антихолинэстеразных веществ с довольно ограниченным кругом заболеваний, при которых они обычно применялись, то можно заметить явное несоответствие. Исследование влияния антихолинэстеразных веществ на высшую нервную деятельность, проведенное в последние годы советскими учеными (см. стр. 240), показало, что их применение в малых дозах стимулирует психическую деятельность и может оказаться полезным при некоторых патологических состояниях. Некоторые антихолинэстеразные вещества могут быть использованы для повышения работоспособности сильно утомленного человека — например, препарат прозамин, смесь прозерина и фенамина (М. Я. Михельсон).

В последнее время в литературе обсуждаются возможности применения антихолинэстеразных веществ для лечения гиперто-



нической болезни. Некоторые авторы наблюдали выраженный гипотензивный эффект от применения у гипертоников эзерина, в особенности в комбинации с ацетилхолином (Endrew, 1957), и препарата S-108 (дийодметилат-N-диэтиламино-N-пирролидиндиэтилового эфира — Limitz, 1959). Наиболее эффективны препараты были в нейрогенной стадии заболевания. У больных с переходной и нефрогенной стадиями заболевания они были неэффективны. Другие авторы считают рекомендации по использованию антихолинэстераз в качестве гипотензивных препаратов ошибочными, так как существует опасение вместо снижения кровяного давления вызвать его подъем в связи с возможным стимулирующим влиянием на ганглионарный симпатический аппарат и надпочечники (М. Я. Михельсон, 1962). Не исключена, однако, возможность, что в случае комбинированного применения антихолинэстеразных веществ с ганглиоблокирующими средствами (например, с гексонием, широко используемым как гипотензивное средство) это нежелательное влияние может быть устранено.

Возможно, что отдельные антихолинэстеразные, в особенности фосфорорганические, препараты могут найти применение в химиотерапии. Экспериментальным обоснованием для такого применения являются данные о тормозящем влиянии ДФФ и фосфакола на размножение туберкулезной палочки и клеток злокачественных опухолей (материал по этому вопросу см. в обзоре Н. А. Лошадкина, 1961), вероятно, вследствие избирательного ингибирования важных для процесса роста алиэстераз (Mendel, Myers et al., 1953).

О наличии антибактериальной активности у серии эфиров дипропил- и дибутилфосфиновых кислот сообщили недавно С. М. Вяселова, О. А. Игнатьева и др. (1962). Обнадеживающими явились результаты, полученные при лечении эрлиховского асцитного рака у мышей фосфаколом (Osswald, 1955) и армином (М. Я. Михельсон, 1962). Японские авторы описали противоопухолевое действие триэтиленфосфорамидов при асцитном типе саркомы Йосида. В дозе 1 мг/кг (в течение недели) препарат полностью излечивал половину подопытных крыс. Проведенный анализ показал, что тетраэтиленфосфорамид тормозит как включение меченого фосфора ( $P^{32}$ ) во все фосфорные фракции опухоли, так и поступление сульфата  $S^{35}$  в клетки опухоли (Toshiro, 1960).

Н. Д. Неклесова и З. Ш. Минюшева (1962) обнаружили у некоторых фосфорорганических соединений в опытах *in vitro* выраженное антигрибковое действие, причем один из препаратов — № 307 (диметиловый эфир  $\alpha$ -ацетокси- $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -трихлорэтилфосфиновой кислоты) оказался малотоксичным для теплокровных животных. На основании обнадеживающих данных по лечению этим препаратом экспериментальной трихофитии животных



он рекомендуется для клинического использования с целью лечения дерматомикозов (З. Ш. Минюшева, И. Д. Неклесова, М. А. Кудрина, 1962).

Определенный интерес представляют данные о защитном эффекте ДФФ при облучении крыс смертельными дозами проникающей радиации. Согласно данным Виллокби (Willoghby, 1961), на третий день после облучения крыс 975 *p* гибнет 60% животных; предварительным введением ДФФ в дозе 3 мг/кг можно было этот процент снизить до 20%. Защитный эффект выражался также в предотвращении поражений желудочно-кишечного тракта в первой стадии заболевания и поражений гемопоэтической системы в более поздних стадиях. Однако делать какие-либо выводы об эффективности ФОС при лучевой болезни человека на основании существующих данных не представляется возможным. В особенности затруднительно это сделать еще и потому, что в литературе имеются данные, свидетельствующие о потенцирующем влиянии фосфорорганических соединений на эффекты проникающей радиации. Так, Митчелл (Mitchell, 1953) обнаружил у некоторых фосфорорганических соединений радиосенсибилизирующие свойства, основанные на их способности угнетать митоз в тканевых культурах фибробластов, что, по-видимому, связано с блокированием клеточных процессов синтеза, связанных с фосфорилированием. Один из препаратов — 2-метил-1, 4-нафтогидрохиондифосфат — усиливал эффективность рентгенотерапии рака бронхов. На возможность утяжеления течения интоксикации при совместном действии табуна и проникающей радиации указали С. Т. Петров и Л. Кръестанов (1961).

Все эти данные представляют бесспорный интерес, но не дают возможности сделать определенных выводов ни о целесообразности использования фосфорорганических соединений для лечения лучевой болезни, ни в отношении практического значения радиосенсибилизирующего действия.

Одной из важных областей практического применения антихолинэстеразных веществ является их использование в качестве противоядий при отравлении веществами холинолитического типа действия. Об антикурарном действии подробно сказано на стр. 208. Что касается использования эзерина и прозерина в качестве антагонистов атропина и других холинолитических веществ, то в соответствующих разделах книги мы об этом упоминали. При рассмотрении практического аспекта этого антагонизма необходимо учитывать конкретные условия применения антихолинэстеразных веществ. Если речь идет о необходимости ослабить только отдельные проявления действия холинолитиков, что может иметь место, например, в случае передозировки последних или повышенной чувствительности к ним, то следует использовать избирательность в действии антихолинэстеразного



вещества. Так, для устранения симптомов центрального действия холинолитических препаратов, например амизила, нужно брать антихолинэстеразное вещество, способное проникать в центральную нервную систему (эзерин, галантамин); когда необходимо устранить симптомы периферического действия холинолитика — напротив, лучше брать прозерин или другой четвертичный антихолинэстеразный препарат, который, проявляя антагонизм на периферии, не будет оказывать побочного влияния на центральную нервную систему. Целесообразно также учитывать возможную избирательность различных антихолинэстеразных веществ в действии на М- и Н-холинореактивные системы. Так, В. Б. Прозоровский (1960) показал, что в возбуждающих эффектах прозерина действие на Н-холинореактивные системы имеет больший удельный вес, чем в эффектах эзерина.

## ТОКСИКОЛОГИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

### ИНТОКСИКАЦИЯ ФОС У ЖИВОТНЫХ

Токсичность ФОС колеблется в чрезвычайно широких пределах — от таких малотоксичных для человека инсектицидов, как карбофос, до нервных газов, которые по своей токсичности занимают исключительное положение даже среди боевых отравляющих веществ («ультраяды», Lohs, 1958). С синтезом нервных газов казалось, что достигнут предел токсичности: смертельная концентрация паров зомана, по данным Штора (Stöhr, 1961), в 40 раз меньше концентрации синильной кислоты, однако в последнее время были синтезированы фосфорилхолины (Tammelin, 1958), отдельные представители которых по своей токсичности значительно превосходят зоман. Вопросы токсикологии наиболее токсичных ФОС, относящихся к боевым отравляющим веществам, подробно рассматриваются в руководствах по санитарно-химической защите (см. Ю. В. Другов, 1959) и в специальных монографиях (Lohs, 1958; Stöhr, 1961) и обзорах (Holmstedt, 1959).

В настоящей книге будут рассмотрены вопросы токсикологии ФОС применительно к инсектицидам, однако нередко для сравнения или выяснения вопросов особенностей интоксикации мы будем прибегать к данным по токсикодинамике табуна и в особенности зарина, который является стандартным ФОС в исследованиях зарубежных авторов.

Токсичность ФОС обусловлена особенностями их химического строения: она зависит от вида животного, пути поступления яда в организм, дозы и времени контакта с ядом, а также от факторов внешней среды (например, температуры).



## СИМПТОМЫ ОТРАВЛЕНИЯ

После введения животному, например собаке, ДФФ в смертельной дозе отмечаются следующие симптомы отравления: беспокойство, мышечные подергивания, возбуждение пиломоторов, резкие затруднения дыхания, судороги, усиление перистальтики кишечника, саливация, спазм мочевого пузыря. Симптомы нарушения дыхания быстро нарастают, смерть наступает через несколько минут при явлениях остановки дыхания и резких расстройств кровообращения. Сердце продолжает сокращаться некоторое время после остановки дыхания.

Введение животному сублетальных доз вызывает более продолжительное отравление с преобладанием двигательных расстройств и нарушений функции дыхания.

Симптомы отравления ФОС поддаются систематизации в зависимости от характера иннервации органов, со стороны которых они наблюдаются. Они могут быть классифицированы следующим образом (табл. 30).

Таблица 30

Симптомы отравления ФОС

Иннервация	Симптомы
Парасимпатическая	Усиленная саливация, тошнота, рвота, понос, тенезмы, лакримация (хромадокриорея у крыс), миоз, бронхоспазм, брадикардия, частое мочеиспускание
Двигательная	Фибрилляции, фасцикуляции, мышечная слабость, атаксия и паралич
Смешанная	Преходящее усиление дыхания, нарушение кровяного давления, расстройства кровообращения, судороги, ацидоз и гипергликемия.  Сокращение селезенки (у собаки)

Несмотря на то, что эта систематизация носит до некоторой степени условный характер, она помогает классифицировать многообразные симптомы отравления ФОС.

Механизмы действия антихолинэстеразных веществ на различные органы и системы рассмотрены нами выше. Поскольку те же механизмы лежат и в основе токсических эффектов ФОС, специальное рассмотрение их в этой главе вряд ли целесообразно.

Непосредственной причиной смерти является асфиксия. Из четырех возможных механизмов асфиксии (бронхоспазм, нервно-мышечный блок дыхательной мускулатуры, центральный пара-



лич, понижение кровяного давления) наибольшее значение, по-видимому, имеет центральный паралич. Значение других факторов неодинаково для разных видов животных. В расстройствах дыхания у кошек большую роль играет бронхоспазм, у кроликов — периферический паралич, у обезьян — паралич дыхательного центра.

Несмотря на общность клинической картины отравления различными ФОС, основанной на общем механизме их действия, в токсикодинамике отдельных соединений имеются свои особенности. Так, для ТЭПФ, ДФФ, фосфакола, нервных газов и других хорошо растворимых в жирах ФОС характерно наличие резких расстройств функционирования не только периферических, но и центральных отделов нервной системы. Фосфорилхолины и другие полностью ионизированные ФОС, а также октаметил (В. К. Збуржинский, 1959) не оказывают четкого влияния на центральную нервную систему, так как не проникают из крови в мозг. В картине отравления меркаптофосом также преобладают периферические симптомы (С. И. Локтионов, 1962).

Токсическое действие ФОС проявляется при различных способах введения, при этом картина отравления остается в основном неизменной, хотя сроки наступления, выраженность, продолжительность и постоянство некоторых симптомов варьируют. Миоз и затруднения дыхания наблюдаются преимущественно при ингаляционном отравлении. Для кожной аппликации характерны мышечные фибрилляции в месте нанесения ФОС на кожу. При поступлении яда в желудочно-кишечный тракт наблюдаются тошнота, рвота, спазмы кишечника и поносы.

#### ИНГАЛЯЦИОННОЕ ОТРАВЛЕНИЕ

Для ингаляционного отравления характерно особенно быстрое развитие симптомов резорбтивного действия. При ингаляционном отравлении токсичность ФОС зависит от концентрации паров и продолжительности их воздействия. Согласно данным Оберста и др. (Oberst et al., 1956), при воздействии абсолютно смертельными концентрациями паров зарина на собак симптомы отравления развиваются исключительно быстро. К концу 1-й мин, а в случае меньших концентраций спустя 4—5 мин после затравки у животных наступали коллапс, апноэ и смерть. При увеличении экспозиции отравление наступает от значительно меньших концентраций.

В опытах В. С. Бурого (1947) октаметил в концентрации 0,008—0,01 мг/л вызывал гибель всех крыс и кроликов на 1—7-й день после однократного воздействия при четырехчасовой экспозиции. Концентрации порядка 0,004—0,006 мг/л вызывали гибель кроликов в течение 3—5 дней при ежедневной динамиче-



ской затравке в течение 4 часов. При практическом применении ФОС отравление может произойти не только от вдыхания паров, но и от пыли (приготовление и применение дустов ФОС). В работе Е. И. Спыну (1957, б) приведены данные о токсичности тиофоса для мышей и крыс при затравке их дустом. При концентрации тиофоса 0,015—0,02 мг/л и четырехчасовой экспозиции из 10 мышей погибли 2. Признаки отравления наступали через 2—4 ч после экспозиции и длились 8—15 ч.

Смертельные концентрации высокотоксичных ФОС в воздухе очень низкие. Так, при 10-минутной экспозиции смертельная доза ДФФ для крыс составляет 0,36 мг/м<sup>3</sup>. Однако на практике ингаляционные отравления ФОС встречаются довольно редко, так как большинство широко применяемых инсектицидов малолетучи. Значительно вероятнее заражение не парами, а пылью, когда инсектицид применяется в виде дуста.

#### НАКОЖНАЯ АППЛИКАЦИЯ

При попадании ФОС на кожу они, как правило, не вызывают местного раздражающего действия. Их всасывание через кожу происходит бессимптомно, за редкими исключениями, причем скорость всасывания для различных ФОС может быть различной. Обычным способом оценки проницаемости кожи для ФОС является простое измерение уменьшения количества нанесенного вещества. Используя этот метод, Ю. И. Кундиев (1962) показал, что при нанесении на кожу меркаптофоса уже через 30 мин на ее поверхности остается лишь незначительная часть препарата (13%). Фредрикссон (Fredriksson, 1958) также отмечает быстрое уменьшение (в течение первых 10—15 мин) количества вещества (зарина), нанесенного на кожу. Более точным методом изучения проникновения ФОС через кожу является определение его количеств в крови и органах либо прямым путем (обнаружение меченого ФОС), либо косвенным — по угнетению холинэстеразы. Для некоторых ФОС скорость проникновения через кожный барьер точно установлена. Для зарина, например, она составляет 1—2 γ в минуту на 1 см<sup>2</sup> поверхности кожи (Fredriksson, 1958). Скорость проникновения через кожу паратиона (установленная методом радиоактивного мазка), согласно данным того же автора (1961а и б), в 25 раз ниже, чем у зарина (5 μмол/см<sup>2</sup> в 1 мин). Нарушение эпидермиса ускоряло всасывание паратиона.

Для сравнительной оценки всасывания через кожу ФОС Ю. И. Кундиев (1962) предлагает использовать так называемый кожно-венозный коэффициент (отношение ЛД<sub>50</sub> соединения при внутривенном введении к ЛД<sub>50</sub> при накожной аппликации). Полученные таким способом данные в определенной мере



согласуются с величиной коэффициента распределения ФОС в системе масло—вода.

Значительный интерес представляет вопрос о зависимости токсического эффекта при нанесении ФОС на кожу от площади аппликации яда. Ю. И. Кунднев (1962) считает, что с увеличением площади аппликации в единицу времени с кожи всасывается большее количество вещества. К аналогичным выводам пришли Мак Файл и Эйди (McPhail, Adie, 1960), которые показали, что при воздействии на кожу кроликов парами зарина их токсичность возрастала по мере увеличения площади контакта яда с кожей. Для характеристики всасывания ФОС кожей определенное значение имеет также процесс возможной детоксикации ФОС в коже. Установлено, например, что фосфакол в коже кролика гидролизует за 1 ч на 20%. Тот же процесс в коже человека происходит в 20 раз медленнее (Fredriksson et al., 1961). Паратон кожей не гидролизует и никаких превращений в ней не претерпевает.

Отсутствие в литературе сравнительных данных по токсичности ФОС при их попадании на кожу не позволяет дать соответствующую оценку для большинства соединений. Клиническая картина отравления при накожной аппликации ФОС в основном обусловлена резорбтивным действием яда и не отличается от других форм отравления. Однако она имеет некоторые особенности, связанные с замедленной (по сравнению с ингаляционным отравлением) скоростью всасывания и некоторыми симптомами, преимущественно местного действия яда.

По наблюдениям Фредрикссона (1958), зарин при нанесении на кожу вызывает фибриллярные подергивания мышц в области нанесения яда. Из ранних проявлений интоксикации следует отметить также сдвиг реакции крови в кислую сторону, уменьшение парциального давления кислорода и увеличение давления  $\text{CO}_2$  в крови. Эти изменения со стороны крови наступали раньше, чем появлялись сколько-нибудь заметные нарушения дыхания и кровообращения.

Е. И. Спыну (19576) исследовала действие технического тиофоса при накожном нанесении кроликам в дозе 1 мл/кг. Через 4—6 ч возникало двигательное беспокойство, саливация, дрожание всего тела, атаксия. Через 20—24 ч животные погибали.

Таким образом, основная особенность интоксикации ФОС при их попадании на кожу состоит в медленном наступлении симптомов отравления, замедленном течении интоксикации и наличии в начальном периоде признаков местного действия яда. Токсичность ФОС при их попадании на слизистые оболочки гораздо выше по сравнению с кожной аппликацией. Так, Кондритцер (Kondritzer, 1956) сообщил, что попадание одной капли зарина в глаз может вызвать смертельное отравление.

Пр  
паят  
чем  
действи  
15 ми  
введе  
облад  
(рвот  
Пр  
в нача  
быстр  
коорд  
чение  
цын, 1  
Тол  
в 3—6  
нием.  
В с  
место  
стемы,  
нее вр  
живот  
лении  
стемы.  
нения  
Selecky  
ства эр  
содерж  
клонен  
содерж  
ЗАВИСИ  
Выя  
химиче  
значите  
обширн  
торами  
раздо  
ствия,  
нами.  
Пре  
очень  
раста  
вопросу  
18 с.



## ОТРАВЛЕНИЕ ПРИ ПОПАДАНИИ ЯДА В ЖЕЛУДОК

При этой форме введения яда симптомы отравления наступают позже, чем при ингаляционном отравлении, но быстрее, чем при накожной аппликации. По данным Е. И. Спыну (1957а), действие тиофоса и карбофоса начинало проявляться через 15 мин после введения масляных растворов в желудок. При введении ФОС в желудок, особенно в начале отравления, преобладают расстройства функции желудочно-кишечного тракта (рвота, понос, кишечные спазмы).

При пероральном отравлении крыс пирофосом и дитиофосом в начале отравления преобладали симптомы угнетения, которые быстро сменялись двигательным возбуждением с расстройствами координации движения. Гибель животных чаще наступала в течение одного часа, реже в течение первых суток (С. Н. Синицын, 1962).

Токсичность ФОС при пероральном введении приблизительно в 3—6 раз меньше по сравнению с внутрибрюшинным введением.

В симптоматике отравлений ФОС обычно наиболее видное место занимают симптомы нарушения функции нервной системы, и это вполне закономерно. Однако проведенные в последнее время углубленные наблюдения за состоянием отравленных животных показали, что функциональные нарушения при отравлении ФОС могут затрагивать самые различные органы и системы. К таким изменениям следует отнести токсические изменения в периферической крови и изменения в печени (Rosival, Selecky, 1955), увеличение содержания гемоглобина и количества эритроцитов и лейкоцитов (Н. К. Стачек, 1962), снижение содержания аскорбиновой кислоты (Н. Н. Пушкина, 1962), отклонения в белковом обмене в печени, почках, сердце, изменение содержания глобулинов в крови (К. С. Казаков и др., 1962).

## ЗАВИСИМОСТЬ ТОКСИЧНОСТИ ОТ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ФОС

Выявление закономерностей, определяющих связь между химической структурой ФОС и их токсичностью, представляет значительные трудности. Поэтому при обобщении чрезвычайно обширного литературного материала, полученного многими авторами, с исключениями из правил приходится сталкиваться гораздо чаще, чем с самими правилами. Наблюдаемые несоответствия, а иногда и противоречия обусловлены многими причинами.

Прежде всего необходимо помнить, что токсичность ФОС очень широко колеблется в зависимости от вида, пола и возраста животных. (Некоторые более подробные данные по этому вопросу приведены ниже.) Это обстоятельство не всегда учиты-



вается исследователями, а особенно выраженное влияние оно может оказать при сопоставлении данных разных авторов.

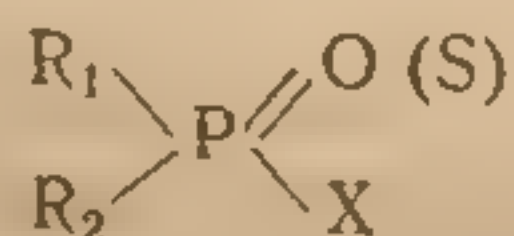
При оценке острой токсичности ФОС не всегда удается учесть то влияние, которое оказывают обменные превращения ФОС в организме. Эти превращения могут быть связаны как с детоксикацией, так и, наоборот, с активированием ФОС, и скорость этих процессов может изменяться по-разному с изменением структуры соединений.

Чрезвычайно важную роль играют физико-химические свойства ядов — например, скорость их спонтанного гидролиза или жирорастворимость. Скорость гидролиза в значительной мере может определять интенсивность детоксикации, а от жирорастворимости зависит способность ФОС проникать через барьеры организма и, следовательно, возможность более или менее выраженного действия на центральную нервную систему.

Наконец, необходимо указать, что очень большое значение имеет чистота исследуемых препаратов. На ряде примеров было показано (Aldridge, Barnes, 1952), что некоторые ФОС могут содержать весьма токсичные примеси, которые резко искажают истинную токсичность изучаемых веществ. Благодаря недостаточной очистке нередки случаи, когда токсичность препаратов инсектицидов меняется от серии к серии.

Перечисленные факторы в очень большой степени затрудняют характеристику зависимости между структурой и действием ФОС, но тем не менее некоторые наиболее общие закономерности, определяющие эту зависимость, могут быть выведены (Holmstedt, 1963).

Рассмотрим уже неоднократно встречавшуюся общую формулу строения ФОС:



Среди соединений, у которых группа X представляет собой галоид или псевдогалоид, наиболее токсичными оказались вещества, где  $R_1$  является алкилом, а  $R_2$  — алкоксигруппой (например, зарин). Соединения типаДФФ, у которых оба радикала являются алкоксигруппами, менее токсичны. Токсичность соединений увеличивается при ветвлении углеродной цепи в алкоксигруппе. Замена фтора в группе X на йод, циан или тиоциан снижает токсичность соединений этого типа.

Среди веществ, содержащих N—P связь в форме алкиламидогруппы, наиболее токсичными оказались соединения, у которых только один радикал представляет собой такую группу, а другой является алкоксигруппой (например, табун). В соединениях этого типа максимальная токсичность достигается, когда  $X = \text{CN}$ . Фтористый аналог табуна, у которого группа CN



заменена на фтор, в 4 раза менее токсичен, чем исходный табун. Как правило, введение в группу X циклических структур снижает токсичность соединений. Исключения составляют фосфакол и армин, которые характеризуются сравнительно высокой токсичностью.

Замена эфирного кислорода на серу чаще всего снижает токсичность соединений, однако и среди тиолатов встречаются высокотоксичные вещества, что до известной степени можно объяснить тем, что тиолаты не разрушаются фосфорилфосфатазой и, следовательно, хуже подвергаются детоксикации. Замена на серу кислорода, связанного с фосфором двойной связью, т. е. превращение соединений в тионаты, содержащие группу  $P=S$ , по существу приводит к утрате токсичности, так как действующим началом этих веществ в организме являются только продукты их окисления или изомеризации.

Менее четкие закономерности характерны для производных пиродифосфорной кислоты. Наиболее токсичными среди соединений этого типа являются тетраэтилпиродифосфат и его моноэтиловый аналог — фосарбин.

Вещества, обладающие исключительно высокой токсичностью для млекопитающих, были найдены среди производных фосфорилхолина. Самым токсичным из этих соединений оказался метилфторфосфорилгомохолин,  $LD_{50}$  которого при внутривенном введении кроликам составляет 0,006 мг/кг. Это же вещество оказалось самым мощным из известных к настоящему времени ингибиторов истинной холинэстеразы. Зависимость между токсичностью ФОС и их антихолинэстеразным действием рассмотрена более подробно на стр. 293.

### ХРОНИЧЕСКАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ

Хроническая интоксикация ФОС, в частности ДФФ, характеризуется развитием спастических параличей, особенно задних конечностей, атаксией, мышечными фибрилляциями, расширением пищевода и кардиоспазмом; в дальнейшем из-за дисфагии у животных развивается истощение, которое приводит к смерти (Gilman, Goodman, 1955).

В опытах Келле и Гильмана (Koelle, Gilman, 1946) собаки получали сублетальные дозы ДФФ дважды в неделю в течение нескольких месяцев. Каждое введение ДФФ вызывало у животных мускарино- и никотиноподобные эффекты, выражавшиеся главным образом в нарушениях двигательной функции желудка и нервно-мышечного аппарата. Мышечная слабость продолжалась несколько недель. Полный паралич развивался в течение 3 месяцев.

Парализующее действие ДФФ на поперечнополосатые мышцы наблюдалось также у кошек, получавших повторные инъекции



ДФФ (Hunt, 1947). Периодическая слабость задних конечностей была очевидной в течение 147 дней. Исследования мышечной функции обнаружили повышение чувствительности к ацетилхолину и неспособность к поддержанию тетануса. У животных отмечалось сужение кардиального сфинктера желудка и дилатация пищевода. Хроническая интоксикация собак ДФФ сопровождалась спазмами мочевого пузыря. Это действие выражалось в явлении недержания мочи. На вскрытии у таких животных мочевой пузырь чаще всего оказывался спастически сокращенным.

Коэн и др. (Cohen et al., 1956) подвергали крыс многократному повторному воздействию парами зарина в минимально действующих концентрациях в динамической камере. Ежедневное падение уровня холинэстеразы эритроцитов составляло в среднем 3,6%, достигая максимальных величин к 17-му дню. Активность холинэстеразы мозга падала не столь быстро, примерно на 1,2% в неделю. Восстановление активности холинэстеразы начиналось с 35-го дня затравки, причем ежедневный прирост активности составлял примерно 1%. Согласно данным Оберста и др. (Oberst et al., 1956), при отравлении крыс сублетальными концентрациями паров зарина в течение 6 ч восстановление активности холинэстеразы эритроцитов заканчивается через 40 дней после прекращения воздействия яда, а фермент мозга не восстанавливается полностью даже через 60 дней.

Динамическая затравка животных (крысы и морские свинки) октаметилом в концентрациях 0,0002—0,0005 мг/л в течение месяца при ежедневной четырехчасовой экспозиции вызывала гибель 50% подопытных морских свинок и 20% подопытных крыс в различные сроки. Эти же концентрации у кроликов на 8-й день затравки при той же экспозиции вызывали снижение холинэстеразной активности сыворотки крови до 15—62%, а на 15-й день уровень активности холинэстеразы доходил до 0,5—16% исходной величины. Одновременно наблюдалось падение веса животных (В. С. Бурый, 1957).

По Броуну и Бушу (Brown, Bush, 1950), близкие концентрации тиофоса (0,0002—0,0008 мг/л) действуют и на холинэстеразу сыворотки крови людей.

Интересно отметить, что в дозах, не угнетающих холинэстеразу, ФОС способствуют росту молодых животных и даже стимулируют образование холинэстеразы печенью, что приводит к увеличению содержания энзима в крови и тканях (Б. Н. Кадыков, 1957).

Наиболее чувствительным показателем для оценки хронического действия ФОС является угнетение активности холинэстеразы. Согласно наблюдениям Н. К. Стачек (1962), чувствительным показателем является также нарушение высшей нервной деятельности (см. стр. 247). С. Н. Сеницын (1962) отмечает



снижение работоспособности у крыс (время плавания) после двухмесячного введения им дитиофоса (суточная доза 1 мг/кг).

В последнее время в литературе стали появляться сведения о неблагоприятном влиянии хронической интоксикации ФОС на потомство. По данным Келоу и Мартона (Kalov, Marton, 1961), у крыс, подвергшихся длительному воздействию карбофосом, рождается неполноценное потомство (к концу третьей недели выживает лишь третья часть потомства, но и оно развивается ненормально). Каких-либо признаков интоксикации у крыс первого поколения не наблюдалось, и все изменения касались только потомства. Полученные результаты и известные данные о влиянии ФОС на мутации насекомых, по мнению автора, делают необходимым более широкое изучение влияния хронического отравления ФОС на потомство.

#### ВИДОВАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЖИВОТНЫХ К ФОС

Представители различных видов животных отличаются по своей чувствительности к ФОС.

Установлено, что в ряду теплокровных животных чувствительность к ФОС в общем возрастает от видов с менее организованной центральной нервной системой к высшим животным. Однако это касается только тех ФОС, у которых сильно выражено действие на центральную нервную систему (ДФФ, зарин и др.), в то время как вещества, у которых преобладает периферическое действие (октаметил, меркаптофос, фосфорилхолины), примерно одинаково токсичны для большинства теплокровных. Для иллюстрации сказанного приводим смертельные дозы ДФФ для различных видов животных (табл. 31).

Относительно высокая токсичность ДФФ для кроликов, по видимому, связана с высокой чувствительностью этого вида животных к никотиноподобным эффектам ФОС (паралич дыхательной мускулатуры). Связи между чувствительностью различных видов животных к ФОС и уровнем активности у них холинэстеразы отметить не удастся.

Земноводные отличаются чрезвычайно низкой чувствительностью к ФОС. По Эдери и др. (Edegy et al., 1960), ЛД<sub>50</sub> фосфакола для лягушки составляет 91 мг/кг, а для жабы — 188 мг/кг, в то время как доза для мыши — 1,13 мг/кг. Интересно отме-

Таблица 31

Токсичность ДФФ для различных видов животных

Вид животного	ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)
Мыши . . . . .	3,0
Крысы . . . . .	1,8
Кошки . . . . .	1,6
Кролики . . . . .	0,4
Обезьяны . . . . .	0,25



тить, что и холинэстераза земноводных приблизительно в 100 раз менее чувствительна к ФОС, чем холинэстераза мыши. Предполагают, что в крови земноводных содержится фермент, разрушающий ФОС.

### ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ФОС

Различия в чувствительности самцов и самок крыс к различным ФОС видны в табл. 32, составленной на основании данных Фраули и др. (Frawley et al., 1952) и Дю Буа (Du Bois, 1957).

Таблица 32

Половые различия в чувствительности к ФОС у крыс

Соединение	ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)	
	самцы	самки
Карбофос (малатион) . . . . .	1375	1000
Хлоротион . . . . .	880	980
Диазинон . . . . .	108	76
Этил-п-нитрофенилтионобензолфос- фат . . . . .	91	14,5
ДДФФ . . . . .	80	56
Потазан . . . . .	42	19
ЕФН . . . . .	36	7,7
Тиофос . . . . .	30	3
ДФФ . . . . .	13,5	7,7

Из таблицы видно, что самки, за редкими исключениями, чувствительнее к ФОС, чем самцы. В отношении соединений, претерпевающих превращения в организме, большая чувствительность самок связывается с более быстрым и интенсивным протеканием у них процессов обмена, участвующих в активации ФОС (Fischetti, 1958).

Исследованиями Сванна и др. (Svann et al., 1958) было доказано, что половые различия в чувствительности крыс к паратиону в значительной мере связаны с гормональными факторами.

Согласно данным В. Б. Прозоровского (1960), самки менее чувствительны к прозерину и эзерину по сравнению с самцами. Это несоответствие с данными для ФОС трудно поддается объяснению.

### ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА НА ТОКСИЧНОСТЬ

По данным Фридмана и Химвича (Freedman, Himwich, 1948), новорожденные крысы более чувствительны к ДФФ, чем взрослые. Во время периода роста выносливость к ДФФ возрастает



до 120-го дня жизни. Пониженную устойчивость новорожденных крыс к ДФФ авторы объясняют меньшей концентрацией холинэстеразы в мозгу у новорожденных крыс и, следовательно, меньшим резервом «охранительного фактора».

В. Б. Прозоровский показал (1960), что выносливость мышей к прозерину до 2-недельного возраста остается низкой, затем резко повышается, достигая максимума к 4 неделям. В то же время имеются данные о том, что выносливость крыс к паратиону с возрастом не изменяется (Swann et al., 1958).

### ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ТОКСИЧНОСТЬ ФОС

Токсичность ФОС возрастает под влиянием повышения наружной температуры (Craig et al., 1959). Лучевая болезнь не оказывает определенного влияния на течение интоксикации ФОС (А. И. Соловьев, 1962). Наркоз несколько повышает (Д. Дюнев, 1958), а зимняя спячка, напротив, понижает (Scaife, Campbell, 1958) выносливость животных к ФОС. Шок также понижает выносливость к ФОС (Vondracek, 1958). Эти разрозненные сведения о влиянии факторов внешней среды на интоксикацию ФОС пока не могут быть систематизированы, но они свидетельствуют о важности этой проблемы.

### УСИЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ФОС ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Проблема потенцирования эффектов ФОС при их совместном применении возникла в связи с тем, что на практике одному и тому же лицу часто приходится работать с различными ФОС. Кроме того, в сельскохозяйственном производстве применяются некоторые комбинации ФОС.

Потенцирование наблюдается при комбинации лишь некоторых ФОС (табл. 33), в других случаях комбинированного при-

Таблица 33

Потенцирование токсичности ФОС при совместном применении  
(Du Bois, 1963)

ФОС	Соотношение эквитоксичных количеств ФОС	Вероятная ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)	Фактическая ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)	Индекс усиления токсичности
Малатион + ЭФН	99% М + 1% ЭФН	403,6	230	1,8
Диптерекс + малатион	16,7% Д + 83,3% М	480,0	220	2,2
Диптерекс + гутион	96,5% Д + 3,5% Г	82,8	55	1,5
Кораль + малатион	12,1% К + 87,9% М	455,0	190	2,4



менения ФОС возможны явления суммирования и антагонизма (Du Bois, 1958).

Как видно из таблицы, наиболее отчетливо эффект потенцирования наблюдается в случае применения малатиона. Полагают, что механизм потенцирования при этом состоит в блокаде разрушения малатиона другим компонентом комбинации, например ЭФН.

### ТОКСИЧНОСТЬ ПРИ ПОВТОРНЫХ ВВЕДЕНИЯХ

ФОС отличаются небольшой широтой токсического действия. Так, максимально переносимая доза армина для кроликов всего в 3 раза меньше, чем абсолютно смертельная доза. Однако диапазон доз, угнетающих холинэстеразу, в организме животного гораздо более широкий. В связи с этим повторное введение животному нетоксических, но угнетающих холинэстеразу доз приводит в конце концов к проявлению токсических эффектов.

В связи с тем, что при каждом последующем введении ФОС действует на фоне все более и более сниженной активности холинэстеразы, его токсичность возрастает. Это наглядно демонстрируется табл. 34, составленной по данным Колвея и Дэвиса (Collway, Davies, 1957).

Таблица 34  
Токсичность зарина для морских свинок в зависимости от исходного уровня активности холинэстеразы

Уровень активности холинэстеразы (%)	Доза зарина (мг/кг)	Эффект
100	0,03	Отсутствие гибели
78	0,03	» »
42	0,03	Гибель 30 %
23	0,03	» 100 %

В условиях повторного введения ФОС выявляется кумулятивное действие. Для проявления кумулятивного действия ФОС необходимо, чтобы интервал между введениями не превышал периода, необходимого для восстановления активности холинэстеразы. Этот интервал, по-видимому, не должен превышать двух дней, в течение которых уровень активности холинэстеразы может частично восстановиться. И действительно, большинство авторов наблюдали кумулятивный эффект ФОС только при их ежедневных или более частых введениях в субтоксических и токсических дозах (табл. 35).



## Кумулятивное действие ФОС

ФОС	Вид животных	Доза	Количество введений и интервал	Эффект	Автор
Меркаптофос	Кошки	1/5—1/10 ЛД <sub>100</sub>	Ежедневно	Смерть через 5—10 дней	Ю. С. Каган, 1957
Армин		Пороговая	»	Смерть через 13—23 дня	М. А. Алуф, 1955
Дитиофос	Кролики	«	3—5 раз (накожно)	Смерть после 3—5 нанесений	С. Н. Синицын, 1962
Зарин	»	Субтоксическая	7 раз ежедневно	Повышение токсичности в 1,5 раза	Coolway, Davies, 1957
Тиофос	Мыши	То же	Ежедневно в течение месяца	Токсический эффект через 1 месяц	Roslval, Selecky, 1955

## ЯВЛЕНИЯ АДАПТАЦИИ

Кумулятивный эффект отчетливо проявляется только в случае повторного введения либо токсических, либо близких к ним доз ФОС. Если же речь идет о применении неэффективных доз, то даже после их многократного повторения кумуляции не наблюдается (М. А. Алуф, 1955). Более того, может развиваться своеобразная адаптация организма к ФОС. Так, в опытах Н. К. Стачек (1962) ежедневное воздействие парами метилмеркаптофоса в концентрации 0,0009 мг/л в течение 2 месяцев не вызывало у кошек видимых проявлений интоксикации, за исключением угнетения активности холинэстеразы к концу первого месяца и нарушения высшей нервной деятельности. Несмотря на продолжавшиеся затравки, у животных восстановилась активность холинэстеразы и нормализовалась высшая нервная деятельность. Более того, активность холинэстеразы сыворотки к концу наблюдения даже повысилась.

Другим примером адаптации является следующий факт. Если большой концентрацией ФОС мгновенно снизить активность холинэстеразы до фатального уровня — наступает смерть; при постепенном воздействии тем же ФОС достижение того же фатального уровня проходит бессимптомно (Heath, 1961). В то же время нужно иметь в виду и возможность появления повышенной чувствительности к ФОС. По данным И. С. Фаермана и др. (1962), такое состояние наблюдается у лиц, перенесших острую интоксикацию меркаптофосом. Механизм этих адаптационных явлений пока остается не ясным. Поскольку адаптация наблюдается и в других условиях опытов, например на нервно-мышечной концевой плантинке, можно думать о вовлечении в этот



процесс различных физиологических систем организма. Эта интересная проблема нуждается в экспериментальном изучении.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФОС

### Угнетение холинэстеразы

Биохимические изменения в организме, наступающие при отравлении ФОС, как уже отмечалось, заключаются прежде всего в угнетении холинэстеразы крови и органов. Однако в условиях целого организма угнетение фермента может существенно отличаться от того, что наблюдается *in vitro*. Это определяется непостоянством концентрации активного ингибитора в различные время после введения ФОС и в различных участках организма. Окончательный эффект, выражаемый степенью угнетения холинэстеразы, зависит от многих факторов. Прежде всего имеет значение способ введения яда. При прямом введении в кровь (внутривенная или внутриартериальная инъекция) вещество очень быстро (в течение 1—2 мин) равномерно распределяется в крови и затем диффундирует в ткани и органы. При накожной аппликации или пероральном введении всасывание происходит значительно медленнее и в большей степени могут сказываться различные побочные реакции, в которые вступают ФОС.

Далее, чрезвычайно важную роль играет липофильность ФОС, определяемая коэффициентом распределения жир — вода, характерным для каждого ФОС. Значение этого фактора состоит в том, что реакция между ФОС и холинэстеразой протекает в водной фазе и конечное угнетение зависит от концентрации ФОС в этой фазе. Но в то же время в организме содержится значительное количество жиров и жироподобных веществ (различное в разных тканях), которые способны экстрагировать ФОС из водной фазы и тем самым уменьшать действующую концентрацию ФОС в его реакции с холинэстеразой. Этот же фактор жирорастворимости в значительной мере определяет возможность проникновения ФОС через мембраны организма (например, через гемато-энцефалический барьер) и тем самым возможность контакта с холинэстеразой, находящейся в участках, защищенных мембранами.

Очень важное значение имеет скорость, с которой происходит ферментативное разрушение ФОС, а также скорость реакции ФОС с другими эстеразами. Совершенно очевидно, что чем выше будет скорость этих так называемых побочных реакций, тем меньшее количество яда сможет вступить в реакцию с холинэстеразой.

Наконец, очень существенными, особенно в поздние сроки после введения ФОС, являются такие процессы, как спонтанная

реактиваци  
разы, т. е.  
синтез бе  
фермента  
шения ско

Не вы  
перечислен  
зависимос  
новки опы  
ние того и  
не поддае  
жет быть,  
яснить те  
час и проти  
встречаютс  
посвященн  
линэстераз  
ФОС *in vi*

Степень  
эстеразы е  
разом зави  
денного ФО  
ви (Grob, K  
казали, что  
разы крови  
висимость  
нейный хар  
тивность о  
жать в вид  
нием дозы  
ально. У ме  
видуальных  
удалось.

При вве  
линэстеразы  
кой степени  
виде лишени  
варительном  
тион и друг

Нескольк  
Далеко не  
ферменты к  
эстеразы мо  
зависит от с  
ский барьер.  
очень мощны  
ную структу



реактивация холинэстеразы, «старение» угнетенной холинэстеразы, т. е. превращение ее в неактивируемую форму, и биосинтез белка холинэстеразы в тканях. Суммарная активность фермента в каждый данный момент будет зависеть от соотношения скоростей этих процессов.

Не вызывает сомнения, что относительная роль каждого из перечисленных факторов будет в широких пределах меняться в зависимости от природы ФОС, вида животного и условий постановки опыта. Нередко значение того или иного фактора не поддается учету, и может быть, этим следует объяснить те различия, а подчас и противоречия, которые встречаются в литературе, посвященной угнетению холинэстеразы при введении ФОС *in vivo*.

Степень угнетения холинэстеразы естественным образом зависит от дозы введенного ФОС. Гроб и Харви (Grob, Harvey, 1958) показали, что для холинэстеразы крови человека эта зависимость носит прямолинейный характер, если активность фермента выражать в виде логарифма (рис. 38). Это значит, что с увеличением дозы ФОС активность фермента снижается экспоненциально. У мелких животных вследствие более выраженных индивидуальных различий такой точной зависимости установить не удалось.

При введении животным большинства ФОС угнетение холинэстеразы крови происходит очень быстро и достигает глубокой степени. Исключение составляют те ФОС, которые в чистом виде лишены антихолинэстеразных свойств и нуждаются в предварительном активировании в печени или других тканях (паразион и другие тионаты, шрадан, димефокс и др.).

Несколько иначе обстоит дело с холинэстеразой мозга. Далеко не все ФОС, быстро и выражено инактивирующие ферменты крови, способны вызвать заметное угнетение холинэстеразы мозга. В этом случае эффект в очень большой степени зависит от способности ФОС проникать через гемато-энцефалический барьер. Многими исследованиями было показано, что даже очень мощные ингибиторы холинэстеразы, если они имеют полную структуру (например, аммониевые или сульфониевые со-

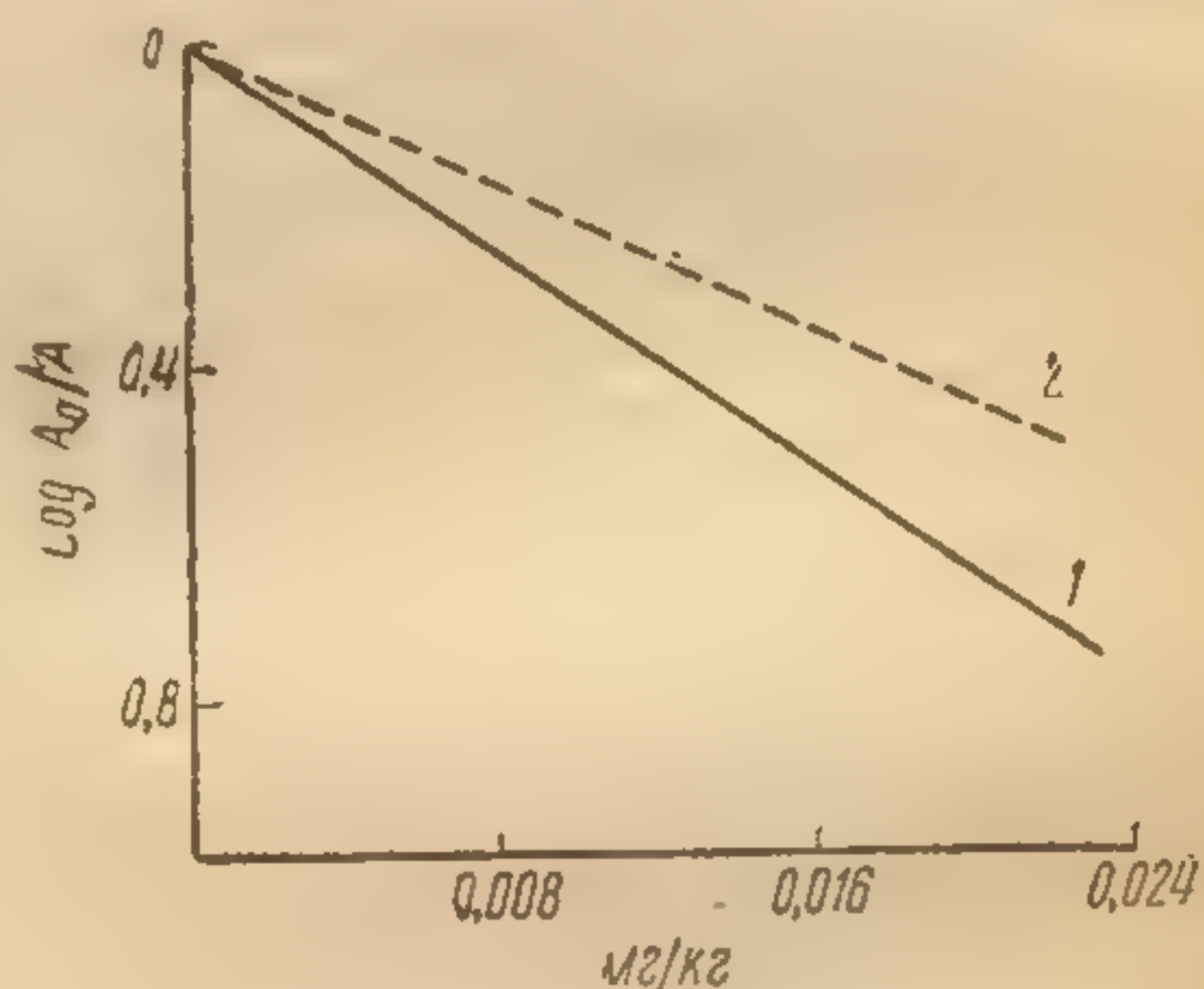


Рис. 38. Зависимость активности холинэстеразы крови человека от пероральной дозы зарина (Grob a. Harvey, 1958).

$A_0$  — активность до приема ФОС;  $A$  — через 2 ч. 1 — холинэстераза эритроцитов; 2 — холинэстераза сыворотки.



единения), при введении в кровь не вызывают значительного угнетения холинэстеразы мозга (Э. В. Зеймаль и др., 1962; Л. Г. Магазанник и И. В. Семенов, 1962; Burgen, Hobbiger, 1951; Koelle a. Steiner, 1956; Fredriksson, 1957; Vandekar, Heath, 1957). Непроницаемость гемато-энцефалического барьера для этих веществ не является абсолютной. Небольшая часть вещества проникает в мозг и вызывает некоторое угнетение фермента.

В случае неионизированных соединений проницаемость зависит от их жирорастворимости. Чем ниже величина коэффициента распределения жир — вода, тем труднее проникают вещества через барьер и тем меньше тормозят холинэстеразу мозга. Например, активный метаболит шрадана отличается очень плохой растворимостью в жирах, и в соответствии с этим при введении шрадана крысам угнетение холинэстеразы мозга составляет лишь 5%, а крови — 9% (Du Bois et al., 1950). Метаболит мипафокса несколько лучше растворим в жирах, и при той же степени угнетения холинэстеразы крови фермент мозга угнетается на 37% (Okinaka et al., 1954). Фосфакол, зарин и ДФФ характеризуются высокой жирорастворимостью, поэтому при отравлении этими ядами обычно наблюдают одинаковую степень угнетения холинэстеразы крови и мозга (Oberst, Christensen, 1956; Kewitz, 1957; Kewitz, Nachmansohn, 1957).

Сравнительное исследование инактивации холинэстеразы разных тканей при отравлении мышей армином и фосарбином показало, что при применении армина имеется полный параллелизм между угнетением холинэстеразы крови и мозга; с увеличением дозы яда степень угнетения фермента крови и мозга возрастала совершенно одинаково. В случае использования фосарбина, особенно в небольших дозах, в крови угнетение было выражено гораздо больше, чем в мозгу (Л. В. Донская и Р. А. Хаунина, 1963).

При оценке данных об угнетении холинэстеразы мозга в опытах *in vivo* следует иметь в виду одно очень важное обстоятельство. Дело в том, что, благодаря наличию в мозговой ткани большого количества жироподобных веществ, там в большей мере, чем в других тканях, проявляется способность этих веществ экстрагировать жирорастворимые ФОС из водной фазы. Та часть ФОС, которая перешла в жировой раствор, способна длительное время сохранять свою активность, но вместе с тем она не угнетает холинэстеразу, потому что отделена от нее пространственно. Когда же в ходе опыта мозг подвергают гомогенизации, у этой части ФОС возникает возможность вступить в контакт с холинэстеразой и вызвать дополнительное угнетение фермента. Поэтому нередко, особенно в кратковременных опытах, наблюдаемое угнетение холинэстеразы выше, чем то, которое имеет место в действительности в неповрежденном мозгу.

Для и  
чески  
ствии  
эстера  
вают  
пробе  
мозга  
экстра  
1957) и  
рушени  
приемо  
шой сте  
Бол  
тивност  
зависит  
каком о  
новлени  
ционног  
эстеразы  
а холин  
1956). П  
сти холи  
скорости  
что свид  
мента. В  
зы, угнет  
В отличи  
ная диме  
тельно бы  
быстрой  
диметокси  
ская и Р.  
ви и моз  
становлив  
ших ДФФ  
Более  
тивности  
зависящие  
казано, чт  
цитов посл  
нилфосфат  
медленнее,  
равномерно  
Greasey, 19  
ной реакти  
А. Н. П  
ДФФ-Р32 во



Для избежания этого артефакта предложено несколько методических приемов. Одни авторы гомогенизируют мозг в присутствии ацетилхолина, который, как известно, защищает холинэстеразу от угнетения ФОС (Schaumann, 1960); другие учитывают наличие свободного яда путем определения в отдельной пробе способности исследуемого мозга угнетать холинэстеразу мозга контрольного животного (Koelle, Steiner, 1956), третьи экстрагируют избыток активного ФОС хлороформом (Kewitz, 1957) или обрабатывают препарат мозга А эстеразой для разрушения свободного яда (Davison, 1955). Применение всех этих приемов может дать различный эффект, который в очень большой степени зависит от деталей техники (Scaife, Shuster, 1960).

Большое число исследований посвящено восстановлению активности холинэстеразы после отравления ФОС. Этот процесс зависит от природы ФОС и вида животного, а также от того, в каком органе определяется холинэстераза. Как правило, восстановление происходит очень медленно. Например, после ингаляционного воздействия парами зарина на крыс активность холинэстеразы эритроцитов достигала исходного уровня через 48 дней, а холинэстеразы мозга — через 140 дней (Oberst, Christensen, 1956). По данным Гроба и др. (1947), восстановление активности холинэстеразы эритроцитов после введения людям ДФФ по скорости совпадает с обновлением эритроцитов (1,2% в день), что свидетельствует о практически необратимом угнетении фермента. В нервной ткани спонтанная реактивация холинэстеразы, угнетенной ДФФ, тоже не происходит (Koenig, Koelle, 1961). В отличие от этого, холинэстераза эритроцитов крыс, угнетенная диметил-п-нитрофенилфосфатом, восстанавливается сравнительно быстро (на 100% через 40 ч), что, вероятно, связано с быстрой спонтанной реактивацией фермента после угнетения диметоксипроизводными (Vandekur, Heath, 1957). Л. В. Донская и Р. А. Хаунина (1961) показали, что холинэстераза крови и мозга мышей, отравленных армином и фосарбином, восстанавливается значительно быстрее, чем у животных, получивших ДФФ.

Более подробное исследование динамики восстановления активности холинэстеразы тоже выявило существенные различия, зависящие от природы ФОС. Так, в опытах на овцах было показано, что восстановление активности холинэстеразы эритроцитов после отравления ТЭПФ, заринном и диметил-п-нитрофенилфосфатом протекает в две фазы: сначала быстро, а затем медленнее, тогда как в случае применения ДФФ имеет место равномерно медленный прирост активности фермента (Blaber, Greasey, 1960а, б). Быстрая фаза, вероятно, связана со спонтанной реактивацией.

А. Н. Панюков (1963) показал, что после отравления крыс ДФФ-Р<sup>32</sup> восстановление активности холинэстеразы мозга про-



исходит более или менее равномерно со средней скоростью 1,01% в день. Примерно с такой же скоростью (1,17% в день) происходило и снижение радиоактивности белково-липидной фракции мозга. Таким образом, процесс новообразования холинэстеразы в мозгу после отравления ДФФ по скорости соответствует распаду комплекса белок — ДФФ.

Мункнер и др. (Munkner et al., 1961) определяли активность холинэстеразы плазмы у людей после введения им ДФФ-Р<sup>32</sup>. Исходя из необратимости угнетения холинэстеразы этим ФОС, по длительности существования Р<sup>32</sup> в крови они рассчитали, что ложная холинэстераза плазмы у человека обновляется наполовину за 16 дней.

Заслуживает внимания, что в некоторых случаях после отравления ФОС фермент достигает активности, значительно превышающей исходный уровень. Например, после отравления цыплят ДФФ активность холинэстеразы плазмы достигла 100% через 7—8 дней, а через 30—32 дня она составляла 250%. Зарин не давал такого эффекта (Austin, Davies, 1954).

В непосредственной связи с инактивацией холинэстеразы находится изменение ацетилхолинового обмена, наступающее при отравлении ФОС (Torda, Wolff, 1947; Koelle, Gilman, 1949). Уже сравнительно давно было получено много данных об ацетилхолиноподобном действии ФОС на мускулатуру глаза, кишечника и сердца. Реакция на ацетилхолин у отравленных животных резко повышается и остается повышенной в течение нескольких дней. Прямые определения содержания ацетилхолина в мозгу показали, что уже в начальных стадиях отравления, когда судороги еще не появляются, отмечается значительное нарастание количества общего и, особенно, свободного ацетилхолина в коре больших полушарий и продолговатом мозгу. В дальнейшем, в период развития судорог содержание ацетилхолина нарастает еще больше (Michaelis et al., 1954).

### Другие изменения

Действие ФОС на обмен веществ в организме не ограничивается их влиянием на превращения ацетилхолина. Голд и др. (Gold et al., 1957) показали, что отравление собак тиофосом и заринном приводит к развитию обменного и дыхательного ацидоза. В начальный период гипервентиляции насыщение артериальной крови кислородом повышалось, а потом резко снижалось. Количество СО<sub>2</sub> в крови увеличивалось, рН крови снижался. Наблюдалось повышение содержания сахара, молочной кислоты и фосфата в плазме. Четкой зависимости между дозой яда и тяжестью наступающих нарушений не было отмечено. Авторы объясняют это тем, что нарушения обмена связаны не только с прямым действием яда, но зависят и от наступающей



асфиксии. Искусственное дыхание снимало часть нарушений, но гиперфосфатемия сохранялась. У атропинизированных собак гипергликемии не наблюдалось.

Многokратное введение малых доз ДФФ или паратиона крысам не влияло на содержание и распределение воды и электролитов в организме (Weller et al., 1955).

Некоторые ФОС (тиофос, октаметил) при введении в организм повышают проницаемость гемато-энцефалического барьера для п-аминобензосульфида. Однако это действие нельзя объяснить их антихолинэстеразной активностью, так как другие вещества, угнетающие холинэстеразу (ДФФ, зарин, эзерин), не влияли на скорость перехода сульфида из крови в мозг (Paulet et al., 1957).

Интересное свойство ФОС было отмечено Поле и Клане (Paulet, Clanet, 1957), которые показали, что после введения собакам ДФФ или ТЭПФ существенно снижается способность сыворотки животных связывать добавленный гистамин. Это действие ФОС коррелировало с их угнетающим влиянием на холинэстеразу эритроцитов, но не плазмы.

При отравлениях ФОС наблюдалось изменение активности не только тех ферментов, которые проявляют к ФОС специфическую чувствительность. Отравление кошек фосфамидом и метилэтилтиофосом вызывало снижение активности каталазы и увеличение активности пероксидазы крови (Т. Н. Паньшина, 1961). У собак, наоборот, активность каталазы повышалась (Д. В. Кириленко и др., 1957). У человека, отравленного паратионом, значительно повышалась активность альдолазы крови (Casula et al., 1960). У крыс отравление фосфаколом приводило к заметному снижению активности моноаминоксидазы в мозгу и печени (Д. В. Кириленко, 1961).

Многие авторы наблюдали у отравленных животных снижение содержания калия в плазме крови (Hazard, Delga, 1954a, б; Paulet, Coq, 1958). Несколько уменьшалось содержание натрия и значительно — кальция (Casula, 1961). Аналогичные изменения были найдены и у человека при профессиональном отравлении паратионом (Casula, 1960a).

Гистохимическими исследованиями было установлено, что при отравлении животных ФОС у них снижается содержание рибонуклеиновой кислоты как в клетках головного мозга (В. В. Соколовский, 1959), так и в клетках желудка, поджелудочной железы и кишечника (Юань Ли-юнь, 1961).

Под влиянием паратиона в митохондриях печени крыс наблюдалось разобщение окислительного фосфорилирования. Паратион не влиял на аденозинтрифосфатазу митохондрий, но резко угнетал активирующее действие динитрофенола на этот фермент (Camba et al., 1962).



При хроническом отравлении крыс и кур паратионом в нервной ткани отмечалось резкое подавление биосинтеза липидов (Majno, Karnovsky, 1961). У мышей введение ДФФ заметно снижало включение  $P^{32}$  в общие фосфолипиды и рибонуклеиновую кислоту ткани мозга (Nelson, Barnum, 1960). У людей, находившихся в контакте с ФОС, отмечались нарушения свертывания крови (Kaulla, Holmer, 1961). Г. Н. Пленина (1961) показала, что введение крысам шрадана сопровождается изменением белкового состава крови: содержание альбумина и  $\gamma$ -глобулина увеличивается, а концентрация  $\alpha$ - и, особенно,  $\beta$ -глобулинов уменьшается.

Клуэ и Велш (Clouet, Waelsch, 1963) нашли, что внутрицистернальное введение крысам вещества 217АО приводит к усилению обмена белков мозга, выражающемуся в повышении включения лизина- $C^{14}$  в белки мозговой ткани, особенно в белки микросомной фракции. В то же время внутримышечное введение крысам фосфакола в судорожных дозах не влияло ни на включение метионина —  $S^{35}$  в суммарные белки мозга, печени и почек (В. И. Розенгарт и М. Н. Маслова, 1956), ни на включение фосфата —  $P^{32}$  в фосфопотеиды мозга (Е. К. Балашова и др., 1958, 1960).

М. Н. Маслова и В. И. Розенгарт (1963) наблюдали отчетливо выраженное изменение содержания  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в мозгу животных, отравленных ДФФ. У крыс в начале судорожного периода содержание  $\gamma$ -аминомасляной кислоты снижалось, затем нормализовалось, а через 30 мин достоверно повышалось. Повышение уровня  $\gamma$ -аминомасляной кислоты при длительных судорогах, вызванных ДФФ, наблюдалось также у кошек.

Из изложенного видно, что при отравлении животных и человека ФОС наблюдается множество самых различных нарушений обмена веществ. Многие из этих нарушений не носят строго специфического для ФОС характера и не обусловлены прямым действием ФОС на те или иные ферменты. Однако при оценке общего состояния отравленных животных и при разработке средств патогенетической и симптоматической терапии с этими нарушениями следует считаться.

#### ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Патоморфологические изменения свидетельствуют о резких расстройствах кровообращения (диффузное полнокровие сосудов, расширение капилляров, отек легких, мозга и других органов) и дистрофических изменениях паренхиматозных органов.

Е. И. Спыну (1957) приводит описание патоморфологических изменений в органах при пероральном отравлении 18 кошек смертельной дозой тиофоса. В опытах автора кошки погибали

спустя  
был об  
сердце,  
у больш  
лительн  
были  
наряду  
отмечен  
стояли  
набуха  
долько  
животн  
ное на  
имели  
пилляр

Засл  
отека л  
отноше  
Извест  
на сосу  
предпол  
щейся  
может  
имеет б

Бол  
изменен  
посколь  
Ю.  
вотных  
каптоф  
ного м  
изменен  
клетках  
мозга.

Одн  
ФОС —  
1962).  
ными д  
(1962).  
морфол  
ряду с  
цифиче  
связан  
шение  
ная им  
утолще



спустя 40--60 мин после затравки. На вскрытии у животных был обнаружен отек мозга, выраженное полнокровие в легких, сердце, печени, почках, селезенке. Изменения сердечной мышцы у большинства животных свидетельствовали о наличии воспалительного процесса в миокарде. У части животных в миокарде были обнаружены дистрофические изменения. В одном случае наряду с полнокровием обнаружен отек легких, в двух случаях отмечены бронхопневмонические очаги. Изменения в печени состояли в острых дистрофических нарушениях в виде мутного набухания и вакуольного перерождения с единичными внутридольковыми мелкоочаговыми некрозами. В почках одиннадцати животных были обнаружены дистрофические расстройства (мутное набухание эпителия извитых канальцев), в двух случаях имели место воспалительные изменения типа острого экстракапиллярного гломерулонефрита.

Заслуживают внимания сообщения ряда авторов о наличии отека легких при отравлении ФОС (Dallemaigne, 1954). В этом отношении имеются и клинические наблюдения (Wirth, 1954). Известно также, что ацетилхолин благодаря своему действию на сосуды вызывает отек легких. На этом основании можно предположить, что и при интоксикации ФОС, сопровождающейся накоплением в организме ацетилхолина, этот механизм может иметь место. Однако основное значение, по-видимому, имеет бронхоспазм.

Большой интерес представляют данные о морфологических изменениях в центральной и периферической нервной системе, поскольку речь идет о синаптических ядах.

Ю. С. Каган и Е. И. Маковская (1957) отмечают, что у животных с выраженной клинической картиной отравления меркаптофосом обнаруживаются поражения нервных клеток головного мозга в виде острых дистрофических и некробиотических изменений. Наиболее тяжелые изменения отмечаются в нервных клетках коры головного мозга, мозжечка и продолговатого мозга.

Однотипные морфологические изменения вызывают и другие ФОС — карбофос, тиофос, метафос и др. (Е. И. Маковская, 1962). Автор считает, что эти изменения не являются специфичными для ФОС. Иного мнения придерживается В. В. Русских (1962), не без оснований утверждающий, что в своеобразной морфологической картине энцефалопатии, вызванной ФОС, наряду с изменениями общетоксического характера имеются специфические структурные изменения синаптического аппарата, связанные с антихолинэстеразными свойствами ФОС (уменьшение размеров синапсов в клетках спинного мозга и их чрезмерная импрегнация солями серебра, деформирование синапсов, утолщение и распад пресинаптических волокон и др.).



Демиелинизация не является характерной для большинства ФОС и постоянно наблюдается, по-видимому, только при отравлении ДФФ, тиофосом и ТОКФ.

### ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ФОС

Как было указано выше, клиническая картина отравления ФОС носит весьма своеобразный характер и в значительной мере напоминает токсическое действие эзерина и других антихолинэстеразных веществ. Поэтому естественно, что еще в первых исследованиях, посвященных изучению действия ФОС, была сделана попытка увязать развитие симптомов при отравлении этими соединениями с угнетением активности холинэстеразы (Nachmansohn, 1947).

В дальнейшем эта мысль была подкреплена многочисленными работами, установившими, что у животных, отравленных ФОС, как правило, наблюдается резкое угнетение холинэстеразной активности всех органов и особенно центральной нервной системы. Постепенно угнетению этого фермента стали придавать все большее и большее значение в оценке токсического действия ядов, и в конце концов создавалась так называемая антихолинэстеразная теория действия ФОС, которая в течение короткого времени получила очень широкое распространение.

Согласно этой теории, угнетение холинэстеразы является единственным патогенетическим фактором в действии ФОС. Благодаря прекращению или значительному уменьшению разрушения ацетилхолина, последний накапливается в тканях в токсической концентрации и обуславливает все многообразие клинической картины отравления. Возрастание концентрации свободного ацетилхолина в крови и тканях животных, отравленных ФОС, в частности в центральной нервной системе, было показано прямыми определениями (Koelle, Gilman, 1949; Michaelis и др., 1954).

Многие исследователи установили, что существует зависимость между степенью угнетения холинэстеразной активности и тяжестью поражения. В случае смертельных отравлений гибель животных, как правило, наступает при полном угнетении активности холинэстеразы мозга. Так, по данным Фридмана и Химвича (Freedman, Himwich, 1948), полученным в опытах на крысах, между дозой ДФФ, симптомами отравления и активностью холинэстеразы мозговой ткани существует строгая зависимость (табл. 36).

В пользу антихолинэстеразной теории действия ФОС многие авторы приводят также факты, указывающие на существование параллелизма между степенью угнетения холинэстеразы различных органов и выраженностью соответствующих эффектов.



Связь между дозой ДФФ, симптомами отравления и активностью холинэстеразы мозга (Freedman, Himwich, 1948)

Доза ДФФ (мг/кг)	Симптомы отравления	Активность холинэстеразы мозга (в мл $\text{CO}_2$ )
0		917
0,5	Сокращение мышц рта, экзотальм	256—409
1,0	Дрожь, фасцикулярные сокращения мышц, слабость задних конечностей	60—178
2,0	Повышенное слюноотделение, дрожь, повышенная реактивность	20—39
3,0	Судороги и смерть	11—16

Макворт и Уэбб (Mackworth, Webb, 1948) обнаружили, что в ряду фосфорорганических соединений, исследованных ими, имеется параллелизм между токсическим действием, миотическим эффектом и способностью угнетать активность холинэстеразы.

Рикер и Веско (Ricker, Wescoe, 1949) нашли, что при введении ДФФ начальное усиление ответной реакции подчелюстной железы на стимуляцию секреторного нерва происходит при угнетении холинэстеразы этого органа на 50%. По мере дальнейшего падения активности холинэстеразы секреция слюны прогрессивно возрастала. Близкие отношения наблюдали Камийо и Келле (Kamijo, Koelle, 1952) в опытах на верхнем шейном ганглии. Изменение реакции третьего века на введение ДФФ было связано исключительно с угнетением истинной холинэстеразы.

В соответствии с антихолинэстеразной теорией находятся и другие важные наблюдения, свидетельствующие о существовании конкуренции между обратимыми ингибиторами холинэстеразы (прозерин, эзерин) и ФОС за активные центры фермента. В опытах *in vitro* было показано, что предварительное введение прозерина или эзерина защищает холинэстеразу от последующего угнетения ФОС (Burger, 1949). Более того, оказалось, что введение прозерина или эзерина животным предупреждает действие ФОС на глаза, поперечнополосатую мышцу и другие органы и защищает животных от токсических доз ядов (Koelle, Gilman, 1946, 1949; Koster, 1946).

Способностью защищать организм животных от токсического действия ФОС и предотвращать гибель при введении смертельных доз ядов обладают некоторые вещества, способные реактивировать холинэстеразу, угнетенную ФОС.

Все эти факты хорошо согласуются с многочисленными экспериментальными данными о действии фосфорорганических со-



единений на отдельные периферические органы и системы, где в большинстве случаев все явления нарушения функции удается связать с замедленным распадом ацетилхолина и накоплением его в соответствующих тканях. Действительно, картина изменений деятельности сердца, желудочно-кишечного тракта, бронхов сходна с тем, что наблюдается при раздражении блуждающего нерва. Ритм сердечной деятельности замедляется, иногда даже происходит кратковременная остановка сердца. Резко повышается тонус и моторная функция всех отделов желудочно-кишечного тракта, что сопровождается рвотой и поносом. Появляется спазм бронхов, вызывающий затруднение дыхания. Повышается выделение слюны и слизи из дыхательных путей. Отмечается слезотечение. При больших дозах яда развивается блок атриовентрикулярного проведения и прогрессивно падает кровяное давление. Чувствительность всех этих систем к ацетилхолину оказывается резко повышенной.

В полном соответствии с этим находится тот факт, что многие холинолитики (атропин, пентафен и др.) обладают выраженным лечебным действием при отравлениях ФОС.

На основании изложенных выше данных многие авторы пришли к заключению, что антихолинэстеразное действие ФОС является не только основным, но и единственным фактором, лежащим в основе токсического влияния этих веществ на организм животных.

Вместе с тем, в ходе изучения действия фосфорорганических ядов на организм постепенно стали накапливаться факты, которые не поддаются объяснению с точки зрения антихолинэстеразной теории. Прежде всего оказалось неясным, действительно ли существует достаточно четкая корреляция между токсичностью ФОС и их антихолинэстеразной активностью.

В обзорной работе Касида (Casida, 1956) сделал попытку обобщить имеющиеся по этому вопросу данные. Для этого он пересчитал результаты исследований многих авторов в отношении ФОС самого различного строения и полученные значения отложил в виде точек в системе координат, где абсцисса выражала антихолинэстеразную активность веществ, а ордината — их токсичность. Четкой корреляции между этими двумя свойствами получить не удалось.

Ю. С. Каган (1962) повторил эту попытку для большого числа исследованных им соединений. К сожалению, антихолинэстеразную активность он определял на ложной, а не на истинной холинэстеразе. Результаты его опытов представлены на рис. 39. Рисунок показывает, что в целом четкой корреляции между антихолинэстеразной активностью и токсичностью нет. Среди изученных Ю. С. Каганом соединений найдены все возможные сочетания этих двух свойств: 1) вещества с высокой антихолинэстеразной активностью и высокой токсичностью; 2) вещества



с высокой активностью и низкой токсичностью; 3) вещества с низкой активностью и высокой токсичностью; 4) вещества с низкой активностью и низкой токсичностью.

Необходимо подчеркнуть, что в третью группу (низкая антихолинэстеразная активность *in vitro* и высокая токсичность) входили главным образом тионовые соединения (содержащие группу  $P = S$ ) и амиды фосфорных кислот, т. е. как раз те вещества, которые подвергаются в организме биологической активации.

Хит (Heath, 1961) произвел аналогичное сопоставление на основе анализа большого числа литературных источников. Од-

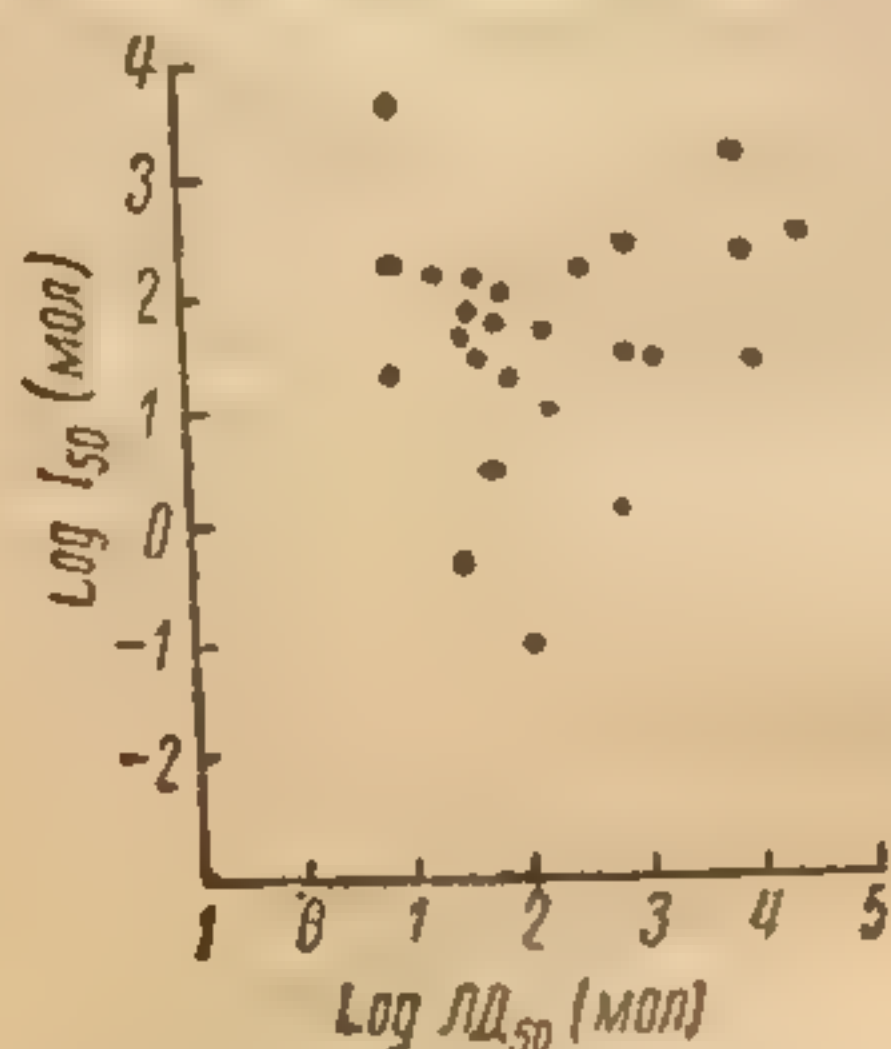


Рис. 39. Сопоставление антихолинэстеразной активности и токсичности различных ФОС (Ю. С. Каган, 1962).

Объяснения в тексте.

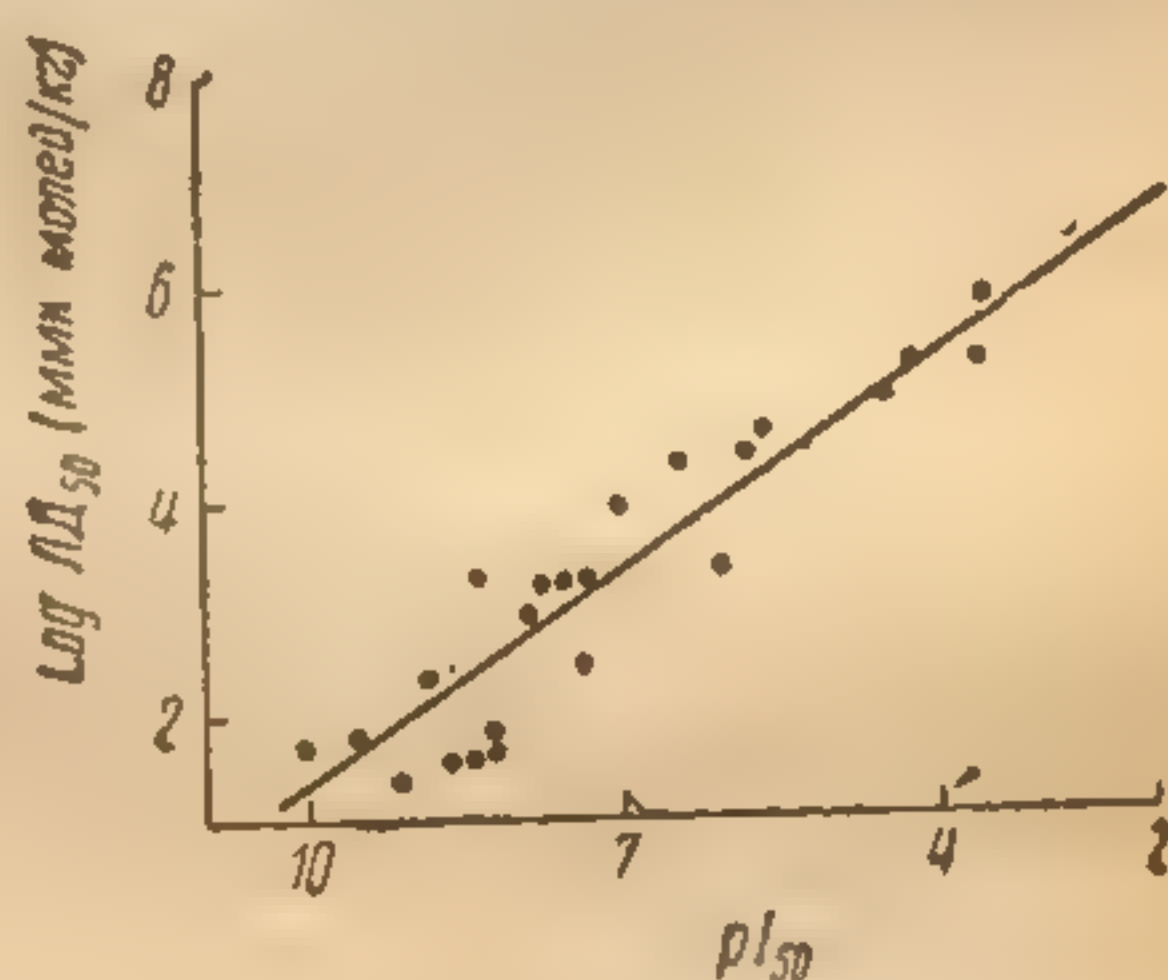


Рис. 40. Корреляция между  $LD_{50}$  и  $pI_{50}$  для 25 ФОС (Heath, 1961).

Объяснения в тексте.

нако к отбору данных он подошел с большой осторожностью. Во-первых, он использовал только те результаты, в которых антихолинэстеразное действие определялось на истинной холинэстеразе. Во-вторых, он исключил все вещества, которые не обладают прямым антихолинэстеразным действием, а подвергаются активации в организме (шрадан, димефокс, паратион и др.). В-третьих, он учитывал только те данные, которые касаются токсичности при внутривенном введении, чтобы исключить различия, зависящие от скорости всасывания веществ в кровь. В-четвертых, он ограничил обобщаемые им данные только исследованиями на мышах, крысах и кроликах, чтобы, по возможности, уменьшить влияние видовых различий. Таким путем ему удалось отобрать 25 соединений, токсичность и антихолинэстеразная активность которых были точно определены. На рис. 40 представлены результаты этого обобщения. Рисунок показывает, что при некотором ограничении в отборе веществ зависимость между токсичностью и способностью угнетать холинэстеразу проявляется с большой убедительностью.



Вместе с тем, нельзя сбросить со счетов большое количество фактов, когда в руках одного автора при исследовании близких по строению ФОС на одном и том же виде животных такая зависимость отсутствовала.

Так, Хоббигер (Hobbiger, 1954a) исследовал большой ряд диалкилфосфорилпроизводных аминфенола и хинолина и показал отсутствие параллелизма между токсичностью изученных соединений и их способностью угнетать активность истинной холинэстеразы.

Особенно ярко это несоответствие проявилось в группе диалкоксипроизводных фосфорилтиохолина (Tammelin, 1958b). Два вещества этой группы — диэтокси- и диизопропоксифосфорилтиохоллин, очень близкие по строению, резко отличались по способности угнетать истинную холинэстеразу: диэтоксипроизводное оказалось в 100 раз более мощным ингибитором фермента. В то же время его токсичность для мышей ( $LD_{50} = 0,35 \text{ мг/кг}$ ) была в 2 раза ниже токсичности диизопропоксифосфорилтиохолина ( $LD_{50} = 0,19 \text{ мг/кг}$ ).

Г. Ф. Ржевская (1960) исследовала свойства большого числа близких по строению смешанных эфиров этилфосфиновой кислоты и тоже показала отсутствие параллелизма между токсичностью и антихолинэстеразной активностью соединений. Аналогичные результаты получила И. В. Заиконникова (1962).

Следующая группа фактов, не укладывающихся в антихолинэстеражную теорию, состоит в возможности существования животных при условии полного угнетения холинэстеразной активности мозга. Это было показано еще в одной из первых работ, посвященных изучению действия ДФФ (Mazur, Bodansky, 1946). Авторы отмечали, что некоторые животные почти бессимптомно переносят отравление ДФФ. Однако при исследовании их мозга после умерщвления оказалось, что холинэстераза была угнетена практически полностью. Было установлено, что постепенное введение малых доз фтористого аналога табуна может привести к полному угнетению активности холинэстеразы мозга, несмотря на то, что симптомы отравления даже не возникают. Гейманс и Джекоб (Neumans, Jacob, 1947) показали, что в известных условиях собаке может быть введена большая доза ДФФ внутривенно, причем наступает полное угнетение активности холинэстеразы мозга, крови и сердца, однако не наблюдается изменений со стороны прямой и рефлекторной возбудимости дыхательного центра и центра блуждающего нерва. Необходимо отметить, что к оценке этих данных следует подходить с осторожностью, так как известно, что полное угнетение холинэстеразы мозга может быть артефактом, зависящим от сохранения некоторого количества свободного ФОС в ткани мозга и последующего угнетения фермента при гомогенизации мозга.



Против антихолинэстеразной теории говорит интересное наблюдение Карчмара и Копаньи (Karczmar, Koppányi, 1953), которые показали, что ДФФ в концентрации  $10^{-9}$  М смертелен для эмбриона хвостатой амфибии *Amblistoma punctatum* на той стадии развития, когда он вообще не содержит холинэстеразы.

Выше были приведены работы, в которых антихолинэстеразное действие ФОС прямо сопоставлялось с их влиянием на отдельные функции, причем был установлен параллелизм между степенью угнетения холинэстеразы и выраженностью соответствующих эффектов. Оказалось, однако, что подобные отношения отмечаются не во всех случаях. Копаньи и Карчмар (1951) изучали способность фосфорорганических ядов потенцировать ганглионарные прессорные эффекты ацетилхолина на атропинизированных собаках. Было показано, что действие этих ядов не связано с их способностью тормозить активность холинэстеразы. Так, одинаковый эффект при действии разных ядов достигался независимо от их антихолинэстеразной активности; даже после полного угнетения холинэстеразы дальнейшее увеличение дозы яда приводило к соответствующему усилению эффекта.

Согласно данным Мак-Намары (McNamera et al., 1951, 1954), ДФФ вызывает обратимое торможение амплитуды потенциала действия нерва и ответа мышцы на нервно-мышечном препарате кошки. Авторы полагают, что этот эффект ДФФ иной, чем действие на холинэстеразу, так как, несмотря на необратимое угнетение фермента, действие на нервно-мышечную проводимость является обратимым.

В исследовании Робинсона и др. (Robinson et al., 1954) было установлено, что введение кошкам и крысам ДФФ приводит к угасанию коленного рефлекса, причем через короткое время рефлекс спонтанно восстанавливается. Повторное введение яда снова угнетало рефлекс, и опять можно было наблюдать восстановление. Оказалось, что не существует никакой корреляции между этим периодическим изменением рефлекторной деятельности и активностью холинэстеразы центральной нервной системы. Уже первое введение ДФФ приводило к резкому угнетению фермента, и в дальнейшем его активность оставалась заторможенной.

Остин и Дэвис (Austin, Davies, 1954) показали, что и развитие параличей, вызываемое введением ДФФ цыплятам, не связано с инактивацией холинэстеразы. По данным И. В. Комиссарова (1957), действие фосфакола на флексорные рефлексы тоже нельзя полностью объяснить угнетением холинэстеразы.

Поле (Paulet, 1956) и Поле и Андре (Paulet, Andre, 1957) в опытах на собаках сопоставляли антихолинэстеразное действие различных ФОС с их способностью нарушать функцию дыхательного центра, которую они оценивали путем регистрации частоты дыханий, легочной вентиляции и определения пря-



мой и рефлекторной возбудимости; в этих опытах также не было отмечено никакого параллелизма между нарушениями функции дыхательного центра под действием ФОС и степенью торможения холинэстеразы продолговатого мозга.

На основании изучения действия различных ФОС на слюнные, кишечные и желудочные железы К. С. Шадурский и сотр. пришли к заключению, что антихолинэстеразное действие ФОС является только начальным, так как даже в периоде восстановления активности холинэстеразы продолжается увеличение секреции.

Подводя итог всем изложенным данным, можно заключить, что ФОС наряду с антихолинэстеразным действием обладают способностью непосредственно влиять на эффекторные структуры органов. Существуют прямые экспериментальные данные, подтверждающие этот вывод. Так, Вербек (Verbece, 1949) показал, что брадикардия, вызываемая большими дозами ДФФ, является следствием прямой стимуляции внутрисердечных ганглиев.

В пользу непосредственного действия ФОС на ганглии убедительные данные приводят Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева (1957). Они показали, что предварительное выключение внутриорганных ганглиев изолированного отрезка кишечника охлаждением или фармакологическими ганглиоблокирующими веществами снимает эффект действия фосфакола на кишку. При повторных воздействиях фосфакола кишка способна отвечать только на 3—4 последовательных введения этого вещества, после чего реакция исчезает — по-видимому, также вследствие действия фосфакола на ганглии (паралитическая фаза действия). Снятие никотином эффекта действия фосфакола на предсердие кошки, а также отсутствие его действия на безнервное образование (амнион 7—8-дневного куриного зародыша) с сохранением чувствительности этих перепаратов к ацетилхолину также свидетельствуют о зависимости действия фосфакола от наличия внутриорганных ганглионарного аппарата (Т. М. Турпаев и Т. Г. Путинцева, 1957).

Анализируя действие моноизонитрозоацетона (МИНА) при отравлении крыс и собак заринном, Фулу (Foulhoux, 1958) установил, что существует параллелизм во влиянии МИНА на эффекты зарина и никотина. Это позволило ему заключить, что токсичность зарина обусловлена не только способностью угнетать холинэстеразу, но и прямым действием на ганглионарные рецепторы.

Фредрикссон и Тиблинг (Fredriksson, Tibbling, 1959) показали, что различные производные фосфорилхолина вызывают сокращение прямой мышцы живота лягушки и 12-перстной кишки кролика, несмотря на то, что холинэстераза в этих препаратах была полностью угнетена предварительной обработкой



зарин. Найденный эффект был отнесен за счет прямого действия на рецепторы. Аналогичные результаты несколько ранее были получены при изучении действия фосфорилхолинов на кровяное давление кошки (Fredriksson, 1958a, б).

Нервно-мышечный блок, развивающийся после введения ФОС, вероятно, связан не только с деполяризующим действием накопившегося ацетилхолина, но и с прямым действием ФОС на нервно-мышечные синапсы, так как он может быть воспроизведен и после полного угнетения холинэстеразы в мышце (Murtha et al., 1955).

Никотиноподобные эффекты ФОС, возможно, связанные и с прямым действием веществ на Н-холинореактивные системы, изучены крайне недостаточно. Имеются, однако, данные с другими антихолинэстеразными соединениями, из которых явствует, что эзерин и прозерин обладают так называемым «побочным» действием, которое объединяет эффекты непосредственного влияния на холинореактивные системы (Feldberg, 1945). Повидимому, и антимиастенический эффект прозерина и оксамизила (амбеноний) связан не только с их способностью угнетать холинэстеразу (Л. Б. Перельман и др., 1962). Полагают, что непосредственное влияние ФОС на Н-холинореактивные системы проявляется главным образом в случае введения больших доз яда, а также при хронических интоксикациях. На этом основании некоторые авторы считают, что механизм действия малых и больших доз ФОС неодинаков (Parkes, Sacra, 1954).

Известную способность ФОС sensibilizировать ткани по отношению к ацетилхолину справедливо объясняли антихолинэстеразным действием. Однако постепенно стали появляться данные, свидетельствующие о том, что холиносенсибилизирующее действие ФОС нельзя приписать исключительно угнетению холинэстеразы. Так, Коэн и Постумус (Cohen, Postumus, 1955, 1957) в опытах на прямой мышце живота лягушки и на нервно-мышечном препарате крыс установили, что ДФФ и зарин в низких концентрациях sensibilizируют мышцу не только к ацетилхолину, но и к бутирилхолину и сукцинилхолину, т. е. к веществам, которые не гидролизуются под действием холинэстеразы мышечной ткани. Перечисленные яды sensibilizировали мышцу также к холину, декаметонию и тензилону, которые вообще не являются эфирами. Сенсибилизирующее действие ДФФ и зарина, в отличие от их способности угнетать холинэстеразу, оказалось обратимым и могло быть снято повторным промыванием мышцы раствором Рингера.

Аналогичные результаты были получены и в опытах С. Н. Голикова и др. (1958), в которых фосфакол sensibilizировал прямую мышцу живота не только к ацетилхолину, но и к карбохолину, который не разрушается холинэстеразой.



Из сказанного видно, что признание за антихолинэстеразным механизмом исключительной роли в патогенезе интоксикации ФОС в настоящее время уже не может считаться оправданным в связи с наличием достаточно веских доказательств в пользу существования прямого, помимо влияния на холинэстеразу, действия ФОС на холинореактивные системы.

Необходимо учитывать и другие возможности действия ФОС на холинореактивные системы. Фельдберг (Feldberg, 1945) справедливо замечает, что при действии различных антихолинэстераз могут наступить дополнительные изменения как в функции холинергических нервов, так и в реактивности рецепторов, вызванные тем фактом, что на месте освобождения ацетилхолина больше уже не образуются, возможно, биологически активные продукты его гидролиза — холин и уксусная кислота. Можно также допустить, что холин, образовавшийся вследствие гидролиза, используется для нового синтеза ацетилхолина. Если это так, то предотвращение гидролиза ацетилхолина антихолинэстеразным веществом будет мешать этому процессу, т. е. нарушать синтез ацетилхолина. Весьма вероятно, что накопление ацетилхолина в организме связано не только с прекращением его ферментативного гидролиза, но и с освобождением из белкового комплекса. Так, Ю. Г. Федорчук (1957) в опытах на перфузируемом верхнем шейном ганглии установил, что после воздействия на ганглий количество свободного ацетилхолина в перфузате может возрасть и после полного торможения холинэстеразы.

При общей оценке патогенеза интоксикации, помимо возможности действия ФОС на холинореактивные системы, необходимо учитывать еще одно важное обстоятельство, а именно — различную способность ФОС проникать через гемато-энцефалический барьер, зависящую главным образом от липидофильности ФОС. В результате этого различия в одних случаях основной патологический процесс разыгрывается в центральной нервной системе, в других (как это имеет место при отравлении октаметилом, а также аммониевыми и сульфониевыми соединениями) — на периферии.

Известно, что многие ведущие симптомы отравления, взятые каждый в отдельности, могут привести к гибели животного. К ним относятся: паралич дыхательного центра, бронхоспазм, паралич диафрагмы и др.

В возникновении каждого из этих симптомов могут играть роль как центральные, так и периферические компоненты, причем относительная роль центральных и периферических влияний может меняться от случая к случаю.

Скорость возникновения того или иного симптома, тяжесть его протекания и его роль в исходе интоксикации зависят не только от природы ФОС, но и от многих других факторов,



главными из которых являются доза яда и путь его введения в организм, вид, возраст и пол животного, а также функциональное состояние нервной системы.

При изучении механизма действия ФОС на целый организм необходимо учитывать все эти факторы, так как каждый из них может оказать более или менее выраженное влияние на развитие патологического процесса.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ОТРАВЛЕНИЙ ФОС

Исследования в области изыскания противоядий ФОС исходят из современных представлений о механизме действия антихолинэстеразных веществ в животном организме (см. стр. 290).

Поскольку отравление ФОС обязано угнетению холинэстеразы и отчасти непосредственному их действию на холинорецепторы, рациональными способами терапии следует считать все виды воздействия на процессы, связанные с холинергической передачей в организме, а также химическую нейтрализацию ФОС и торможение их активирования в организме. Основные направления исследований по экспериментальной терапии интоксикаций ФОС представлены в табл. 37.

Таблица 37

Основные направления исследований в области экспериментальной терапии интоксикации ФОС

Пути воздействия	Препараты
Блокирование холинореактивных систем	Холинолитические средства
Реактивация холинэстеразы	Гидроксамовые кислоты, оксимы
Химическая нейтрализация ФОС	» » »
Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС	Прозерин и другие обратимые ингибиторы холинэстеразы
Возмещение холинэстеразы	Препараты очищенной холинэстеразы
Усиление биосинтеза холинэстеразы	Производные дифенилгликолятов
Подавление синтеза и освобождения ацетилхолина	гемихолиний, морин
Ускорение гидролиза ФОС	Хлорированные углеводороды
Торможение активирования ФОС	SKF-525A



## БЛОКИРОВАНИЕ ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ

Еще в 1869 г. Шмидеберг и Коппе, выделившие из мухоморов мускарин, показали, что его эффекты противоположны атропину, который предупреждает или устраняет токсическое действие мускарина. Вскоре было установлено, что таким же действием атропин обладает и при отравлении эзерином. Дальнейшее изучение показало, что атропином можно предупредить отравление кошек 15-кратными смертельными дозами эзерина (Weis, 1926). Антидотный эффект атропина по отношению к эзерину объясняется физиологическим антагонизмом между указанными веществами, как антиподами в действии на одни и те же системы животного организма. Таким образом, атропин относится к антидотам (противоядиям), предупреждающим или устраняющим токсические эффекты эзерина (В. М. Карасик, 1962).

Атропин является антагонистом ФОС в их действии на М-холинореактивные системы организма. Внутривенное или внутримышечное введение атропина в дозе 2 мг/кг и более за несколько минут до отравления оказывает выраженное защитное действие в опытах на различных животных, включая обезьян. Введение атропина на фоне развившейся интоксикации оказывается несколько менее эффективным, но чаще всего обеспечивает выживание большинства животных. В опытах В. Е. Салая (1957) на собаках атропин, введенный на фоне остановки дыхания и резкого снижения артериального давления, вызванного смертельными дозами пиропоса или фосфакола, быстро восстанавливал дыхание и кровяное давление. Оказалось, что при таких условиях опытов атропин защищает собак от последующего введения нескольких абсолютно смертельных доз яда. На кошках и кроликах атропин также был эффективен (Holmstedt, 1951). При отравлении крыс эффективность атропина была невелика (В. С. Бурый, 1957). Согласно данным Де Кандоля и др. (De Candol et al., 1957), защитная мощность атропина при отравлении различных видов животных заринном и фосфаколом неодинакова. Она возрастает в следующей последовательности: мыши < кролики < кошки < собаки < обезьяны. В таком же порядке (если не считать кроликов) возрастает и чувствительность животных к этим ядам.

В дальнейшем, однако, выяснилось, что антагонизм атропина с ФОС является ограниченным. Атропин достаточно полно устраняет только симптомы возбуждения М-холинореактивных систем, но вовсе не влияет на никотиноподобные эффекты ФОС, которые в случае применения массивных доз яда могут привести животное к гибели. Атропин оказывает заметное действие на центральные эффекты ФОС как в опытах на животных, так и

при ин-  
ствие  
Эт  
ков в  
в опы  
ность,  
тафен  
и Н-х  
щитны  
ными  
оценку  
атропи  
в отли  
стом Д  
В лите  
ных с  
апрофе  
дотов  
Кол  
ляется,  
Дан  
шо вы  
вотных  
в табл.  
дотов ф  
ческих  
ламин  
и глик  
3) амин  
кислот  
кислот  
пропанс  
(аминаз  
Несм  
нам не  
дования  
между  
веществ  
Наме  
ствием  
1961), г  
ных хол  
тенденц  
эфирной  
Хим  
С. Г. Куз  
ства» (196



при интоксикации людей, но многие авторы считают это действие недостаточным.

Это послужило поводом для испытания других холинолитиков в качестве антидотов ФОС. Так, оказалось, что пентафен в опытах на животных проявляет бóльшую антидотную активность, нежели атропин. По данным В. Н. Саляева (1957), пентафен в дозе 20 мг/кг предупреждает развитие как М-, так и Н-холинергических симптомов и оказывает выраженный защитный эффект при отравлении крыс несколькими смертельными дозами фосфакола. Целый ряд авторов дают высокую оценку пентафену и подчеркивают его преимущества перед атропином. Гейманс (Heumans, 1950), например, считает, что, в отличие от последнего, пентафен является полным антагонистом ДФФ. По мнению автора, таковы же артан и дипаркол. В литературе можно встретить сообщение о высоких антидотных свойствах и других препаратов—например, тропацина, апрофена и др. Особенно интенсивно работы по изучению антидотов ФОС велись в последние годы.

Количество соединений, испытанных с этой целью, исчисляется, вероятно, многими сотнями.

Данные о холинолитических веществах, обладающих хорошо выраженной антидотной активностью при отравлении животных смертельной дозой того или иного ФОС, суммированы в табл. 38. Можно видеть, что исследования по изысканию антидотов ФОС охватывают почти все основные группы холинолитических веществ<sup>1</sup>: 1) эфиры тропина и скопина (атропин, скополамин и др.); 2) аминоалкиловые эфиры замещенных уксусных и гликолевых кислот (дифацил, амизил, монодрал и др.); 3) аминоалкиловые эфиры замещенных циклоалканкарбоновых кислот (пентафен и др.); 4) аминоамиды замещенных уксусных кислот (арпенал); 5) аминокспирты—производные 1,3-аминопропанола (артан); 6) N-аминоалкилзамещенные фенотиазины (аминазин).

Несмотря на столь большое число испытанных соединений, нам не удалось найти исчерпывающего сравнительного исследования, позволяющего вывести строгие закономерности о связи между химическим строением и антидотным действием этих веществ.

Намек на раскрытие общих связей между структурой и действием содержится в одной из последних работ Уилса (Wills, 1961), где он на основании сравнения большого числа различных холинолитиков считает возможным отметить как общую тенденцию более высокую активность соединений со сложноэфирной связью по сравнению с другими типами связи.

<sup>1</sup> Химическую классификацию холинолитических веществ см. в книге С. Г. Кузнецова и С. Н. Голикова «Синтетические атропиноподобные вещества» (1962).



Заслуживает также внимания вывод Люиса и др. (Lewis et al., 1955) о том, что на антидотном эффекте сильно сказывается наличие гидроксила в кислотной части аминоалкилового эфира и замещение фенила в кислотной части на другие циклические радикалы.

Как видно из табл. 38, число холинолитиков, обладающих хорошо выраженной антидотной активностью, при отравлении ФОС достаточно велико. Практически любой холинолитический препарат может быть рекомендован для лечения отравлений ФОС, если только у него достаточно сильным является блокирующее влияние на холинореактивные системы. Однако большего внимания заслуживают те из них, у которых одинаково хорошо представлена как центральная, так и периферическая активность. В этом смысле из отечественных препаратов достойны внимания такие вещества, как скополамин, амизил, апрофен, пентафен и тропацин.

Анализ литературных данных показывает, однако, что идеальных холинолитиков, оптимально сочетающих выраженное влияние на М- и Н-холинореактивные системы как в центре, так и на периферии и обладающих хорошей переносимостью, нет. Это привело к необходимости комбинирования различных холинолитиков.

### Комбинирование холинолитических веществ

Работы в этой области велись в трех основных направлениях: 1) комбинирование атропина с курареподобными веществами и сульфатом магния; 2) комбинирование атропина с ганглиоблокирующими веществами; 3) комбинирование атропина с М-холинолитиками.

#### *Комбинирование атропина с курареподобными веществами*

Паркс и Сакра (Parkes, Sacra, 1954) установили, что *d*-тубокурарином можно защитить мышей от смертельного отравления некоторыми ФОС. Если *d*-тубокурарин (в дозе 0,1 мг/кг, которая близка к смертельной) вводили мышам совместно с ФОС, то он повышал ЛД<sub>50</sub> ТЭПФ примерно в 3 раза; Ro3-0412 — в 15 раз и Ro3-0422 — в 20 раз. Обращает на себя внимание большая эффективность *d*-тубокурарина в случае отравления двумя последними соединениями, которые обладают преимущественно периферической активностью, так как содержат четвертичный атом азота. Механизм действия *d*-тубокурарина в этих опытах целиком сводится к конкурентному блоку. Эффективность *d*-тубокурарина снижается по мере отдаления срока его введения от начала действия яда (Heath, 1961), так как при этом прогрессивно ухудшаются условия для осуществления конку-



Таблица 38

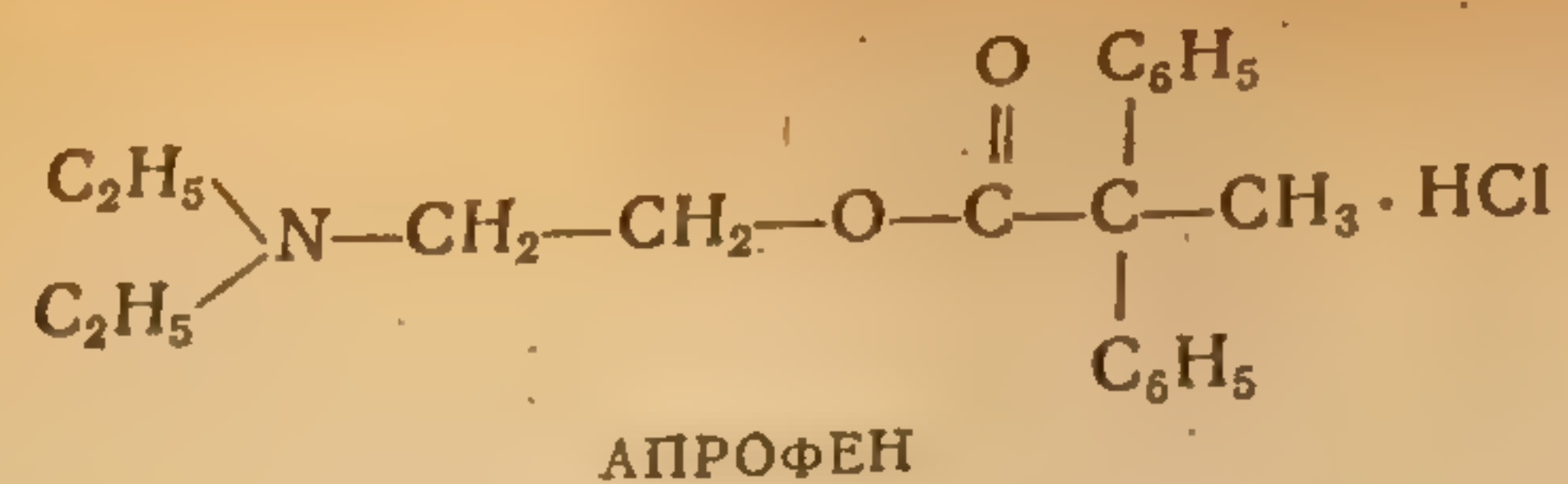
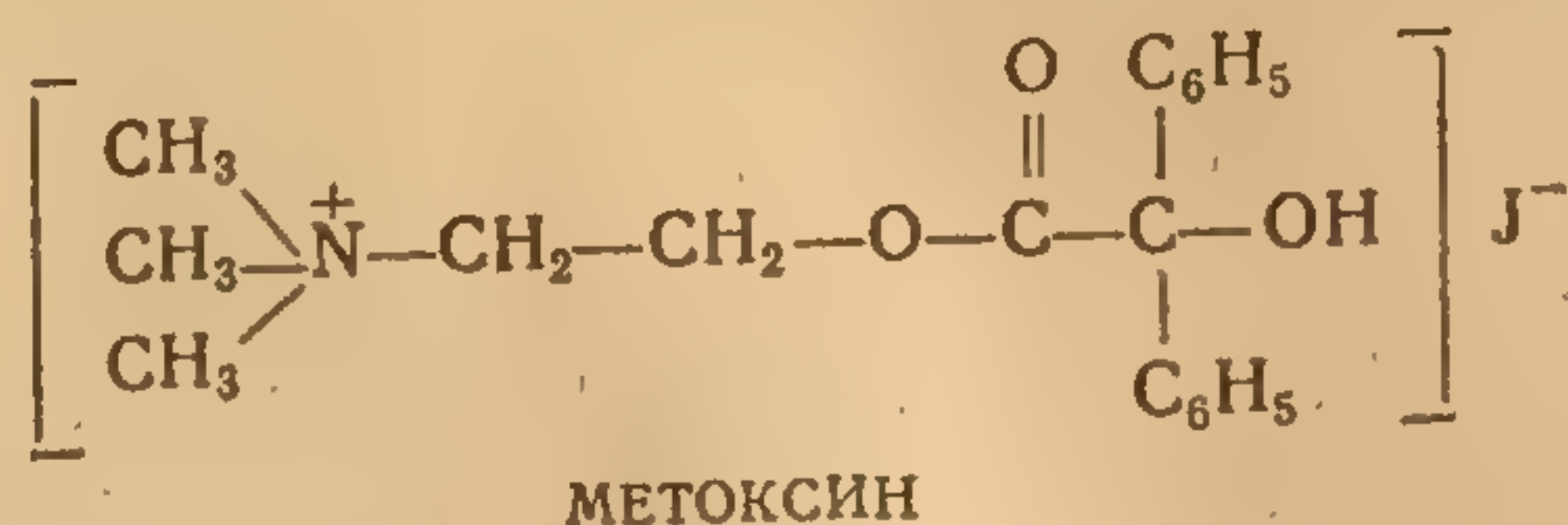
## Холинолитические вещества, испытанные в качестве антидотов ФОС \*

Название и химическая формула холинолитика	Название ФОС	Авторы
$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{N} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{O} - \text{C} - \text{C} - \text{H} \\   \quad   \quad   \quad   \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \right]_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ <p style="text-align: center;">АТРОПИН</p>	ДФФ ТЭПФ Тиофос  Октаметил Фосфакол  Табун Зарин  Меркапто- фос	Koster, 1946; Mc Namara et al., 1946 Hamburger, 1951; Lewis, 1955 Douglas, Matthews, 1951; Salerno, Co- on, 1950; Wilgelmi, Domenjez, 1951 В. С. Бурый, 1957; Du Bois, 1949 В. Н. Саляев, 1957; И. М. Шарапов 1951; Ю. И. Лисункин, 1961 Krop, Kunkel, 1954; Valdivieso, 1961 De Candol, McPhail, 1957; O'Learye et al., 1961 Ю. С. Каган, 1957; Wills, 1955; Gri- betz et al., 1960; Coleman et al., 1962
$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \quad   \\ \text{O} \quad \text{N} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{O} - \text{C} - \text{C} - \text{H} \cdot \text{HBr} \\ \diagdown \quad \diagup \quad   \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p style="text-align: center;">СКОПОЛАМИН</p>	ТЭПФ  Октаметил	Lewis et al., 1955; Douglas, Matthews, 1951. К. А. Вятчанников, 1958
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{N} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{O} - \text{C} - \text{C} - \text{H} \cdot \text{HCl} \\   \quad   \quad   \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \quad \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p style="text-align: center;">ТРОПАЦИН</p>	Тиофос Октаметил Фосфакол	Н. К. Бялко, 1957; Ю. С. Каган, 1957 В. С. Бурый, 1957 Ю. И. Лисункин, 1961



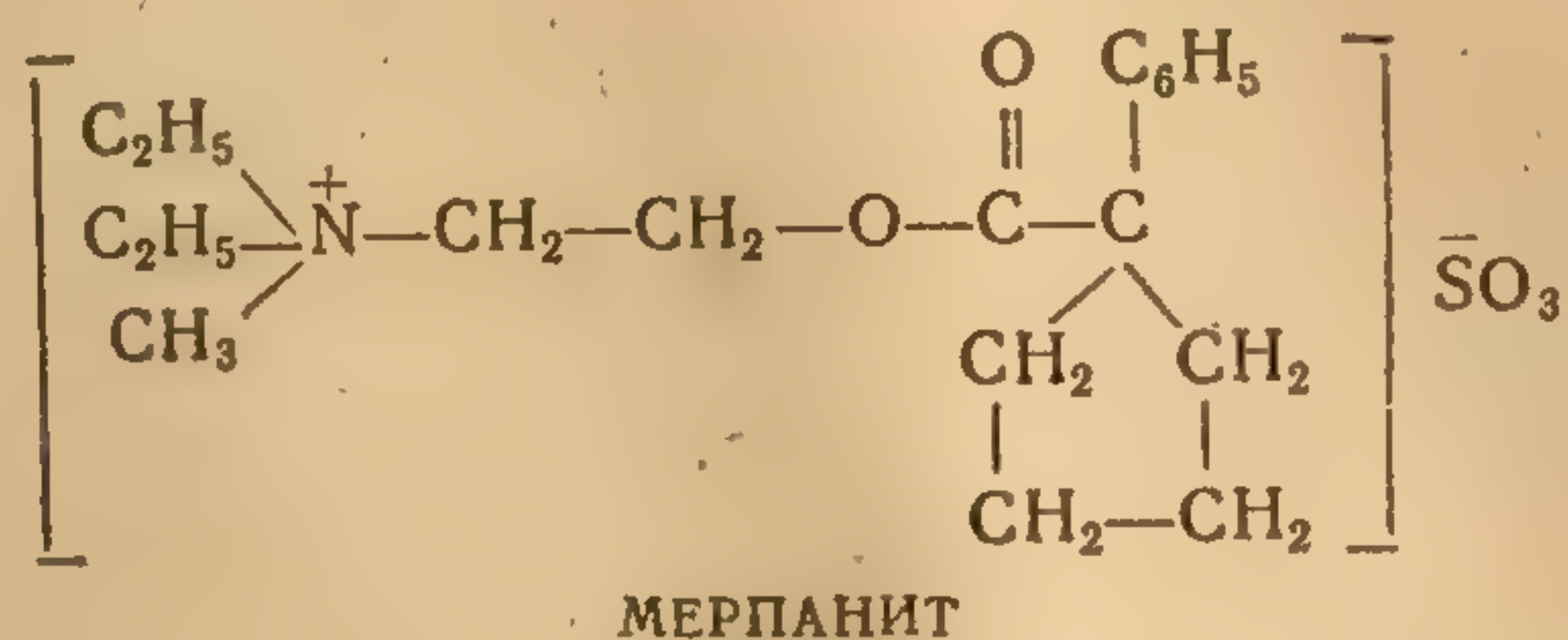
Название и химическая формула холинолитика	Название ФОС	Авторы
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2 \cdot \text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>СПАЗМОЛИТИН (ДИФАЦИЛ)</p>	ТЭПФ Тиофос Фосфакол	Marhold, 1955 Н. К. Бялко, 1957 Ю. С. Лисункин, 1961
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{OH} \cdot \text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>АМИЗИЛ (ДИАЗИЛ)</p>	Тиофос ТЭПФ Фосфакол	Marhold, 1959 Lewis et al., 1955 Ю. И. Лисункин, 1961
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{S}-\text{C}_3\text{H}_4)-\text{OH} \cdot \text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ <p>Win-2299</p>	ТЭПФ	Lewis et al., 1955
$\left[ \begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{C}_3\text{H}_4)(\text{S}-\text{C}_3\text{H}_4)-\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] \text{Br}^-$ <p>МОНОДРАЛ</p>	Зарин	Wills, 1956
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{CH}_3 \cdot \text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	Тиофос Дитиофос	Lewis et al., 1955 А. Е. Диденко, 1961



Тиофос  
ДитиофосLewis et al., 1955  
А. Е. Диденко, 1961

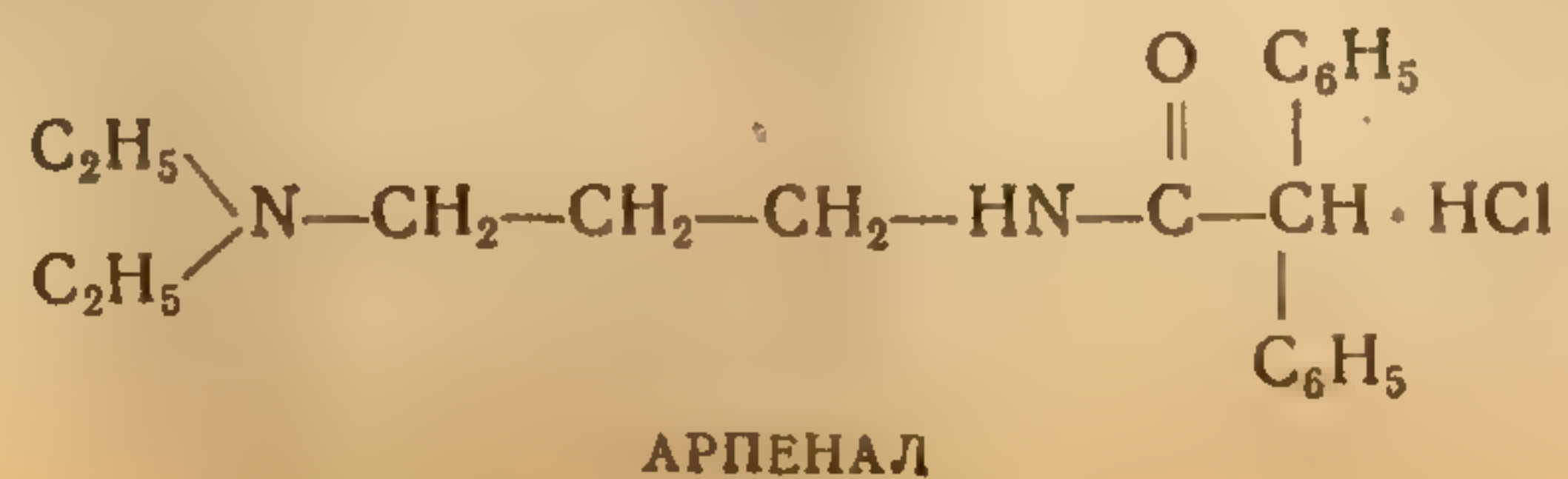
Тиофос

Н. К. Бялко, 1957



Дитиофос

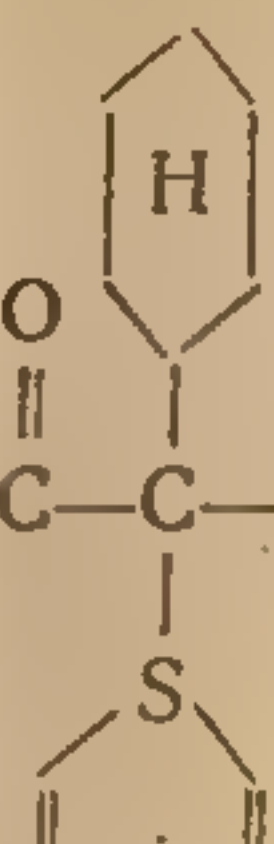
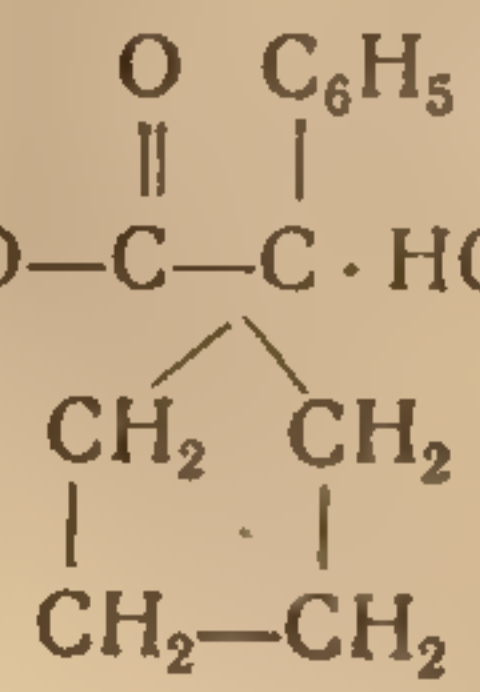
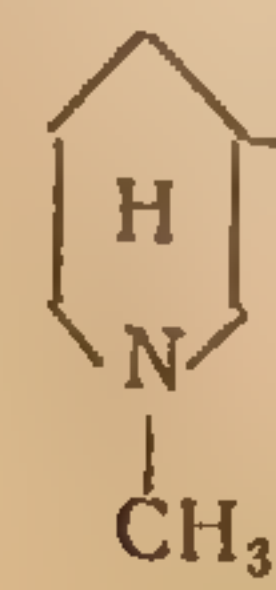
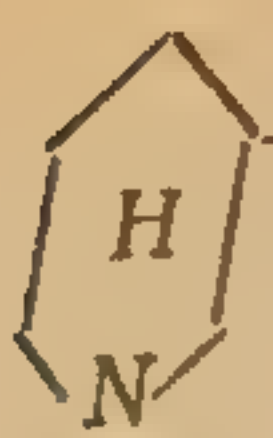
А. Е. Диденко, 1961



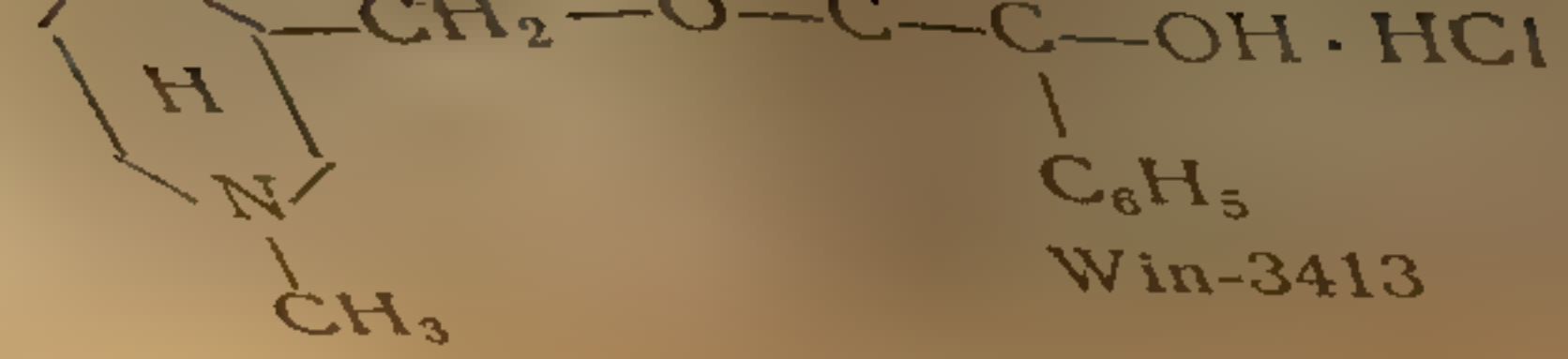
Дитиофос

А. Е. Диденко, 1961

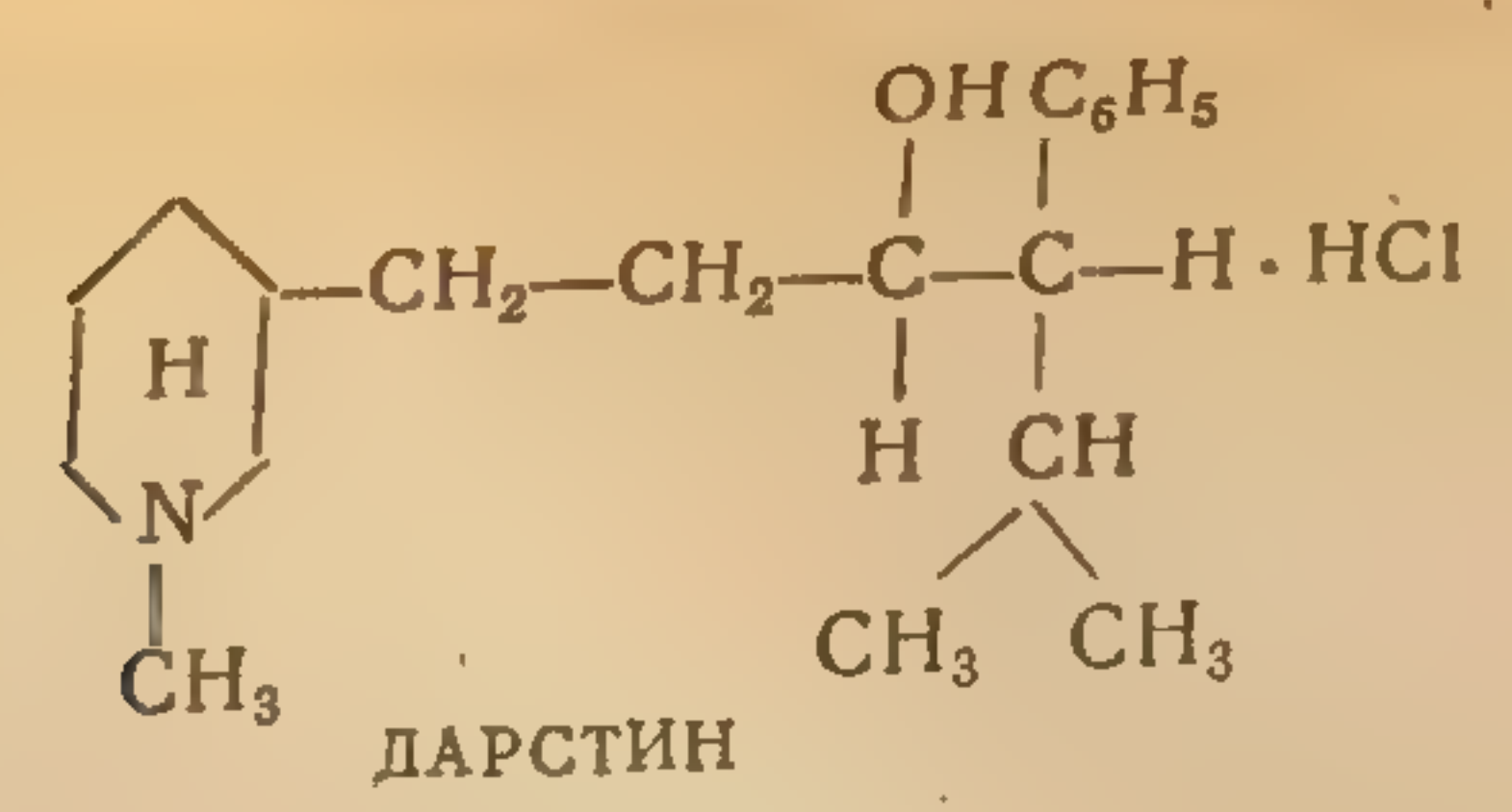


Название и химическая формула холинолитика	Название ФОС	Авторы
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{OH})\cdot\text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Win 5779-6</p> </div> </div>	Зарин	Coleman et al., 1962
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{H})\cdot\text{HCl} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>ПЕНТАФЕН</p> </div> </div>	ДФФ Метафос Тиофос  Октаметил  Фосфакол  Меркапто- фос Зарин	Neumans, 1950 И. Т. Брахнова, 1957 а, б Н. К. Бялко, 1957; Ю. С. Каган, 1957 В. С. Бурый, 1957; Х. Г. Чичин, 1959, 1960, 1962 В. Н. Саляев, 1957; Ю. И. Лисункин, 1961 Ю. С. Каган, 1957
$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{OH})\cdot\text{HCl} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Win-3413</p> </div> </div>	ТЭПФ	Lewis et al., 1955
$\begin{array}{c} \text{OH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{H} \cdot \text{HCl} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{CH} \end{array}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> </div>	ТЭПФ Нервные газы	Wills, 1955; Lewis et al., 1955; Valdivieso, 1961 Wills, 1956



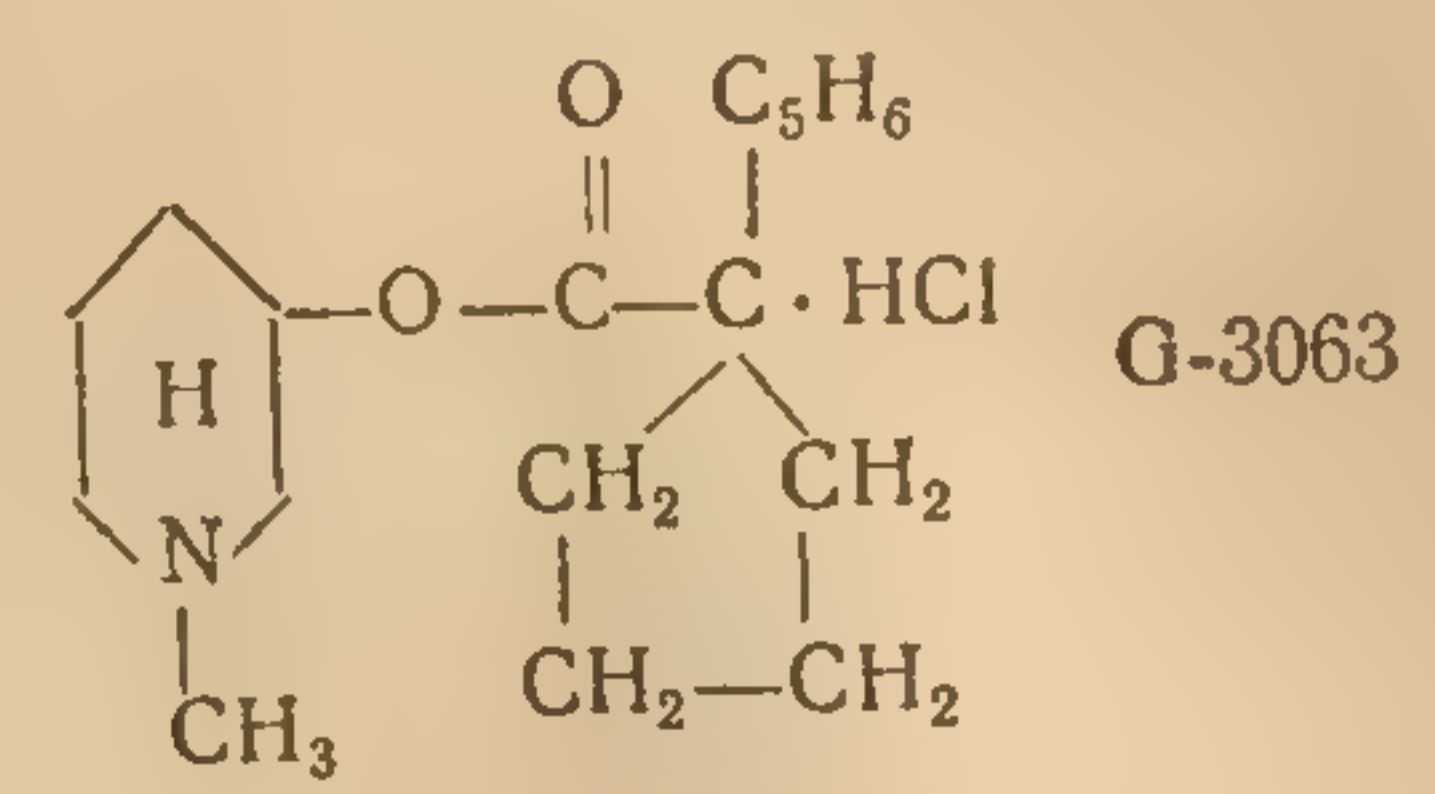


20\*



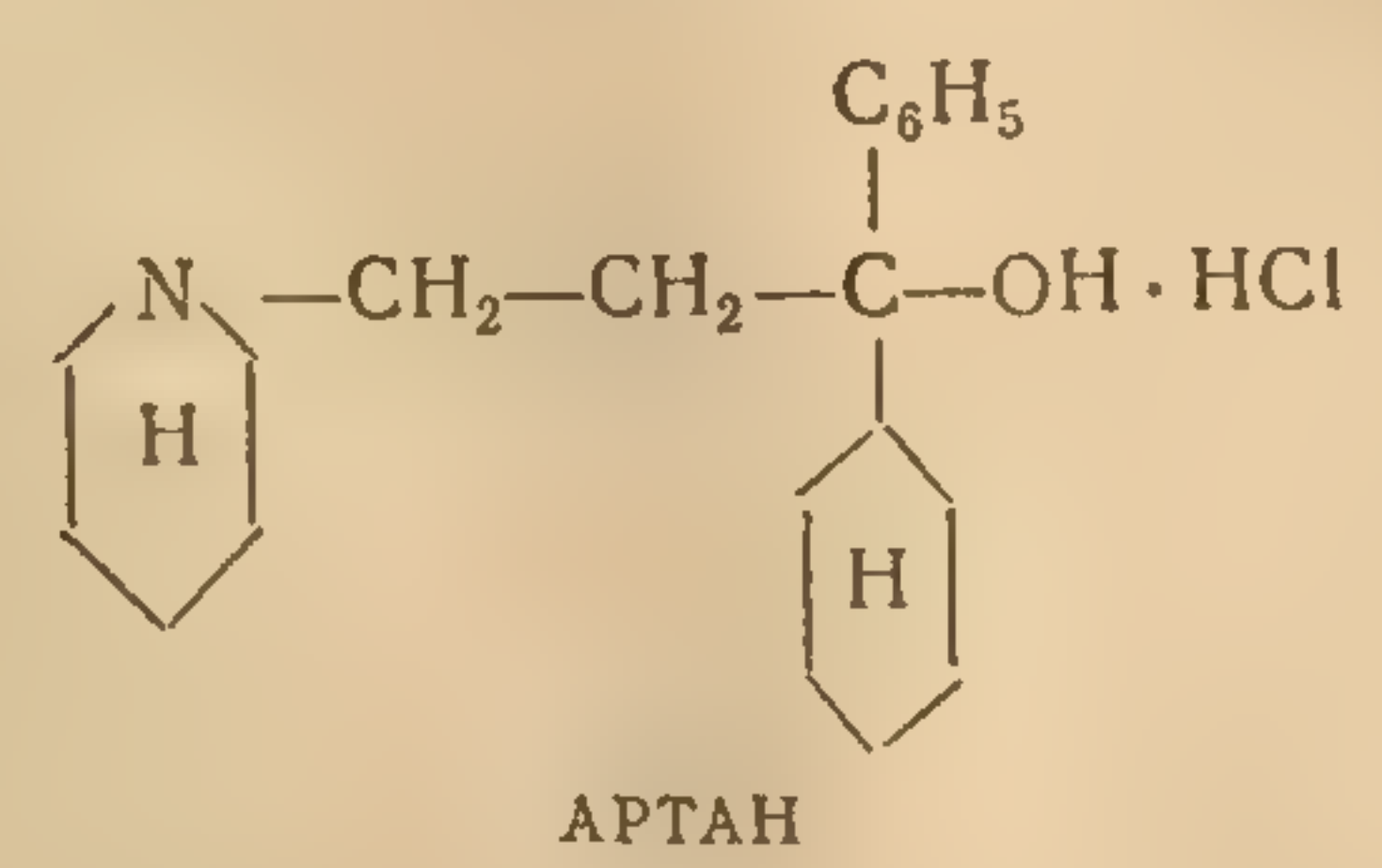
ТЭПФ  
Нервные газы

Wills, 1955; Lewis et al., 1955; Valdivieso, 1961  
Wills, 1956



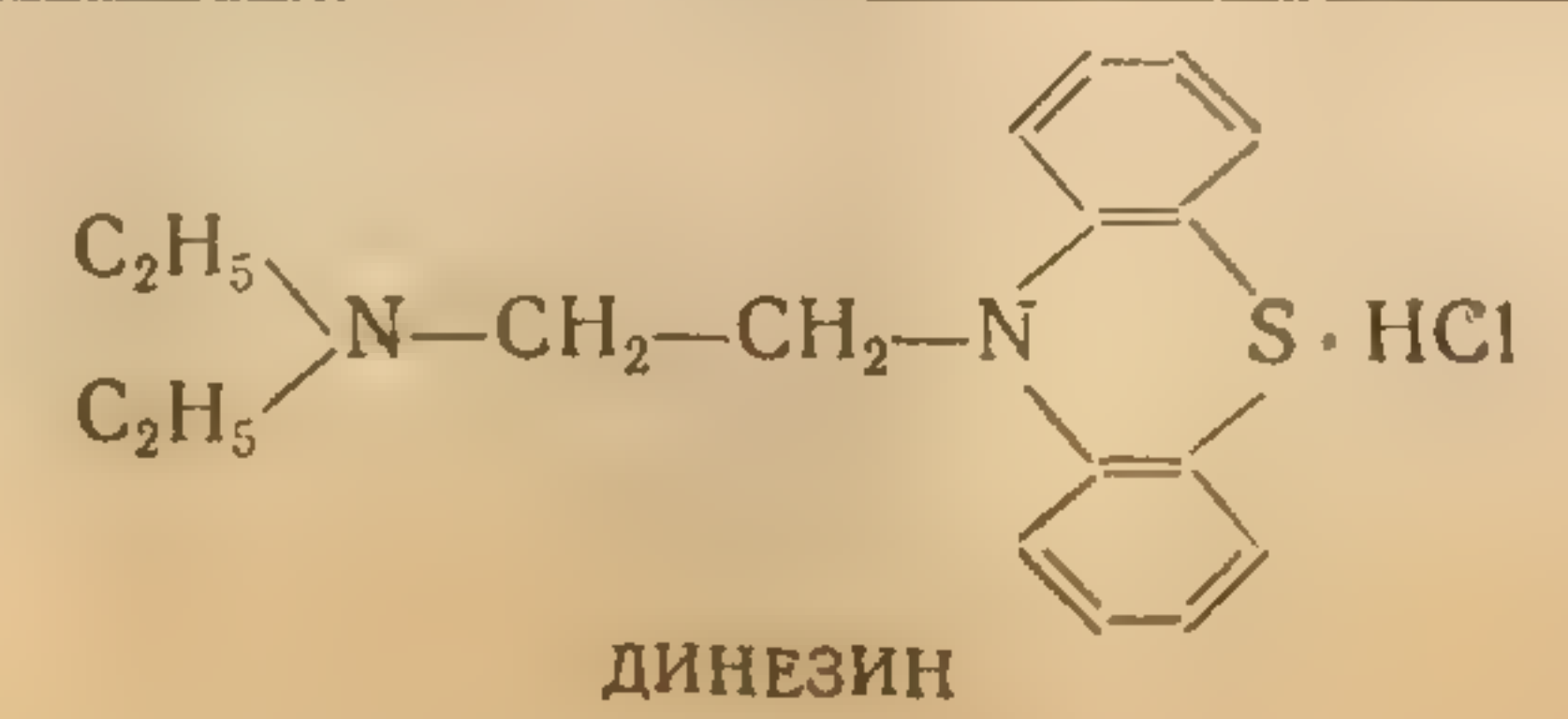
Зарин

Colleman, 1962



ДФФ  
ТЭПФ  
Зарин

Heymans, 1950  
Lewis et al., 1955  
Wills, 1961

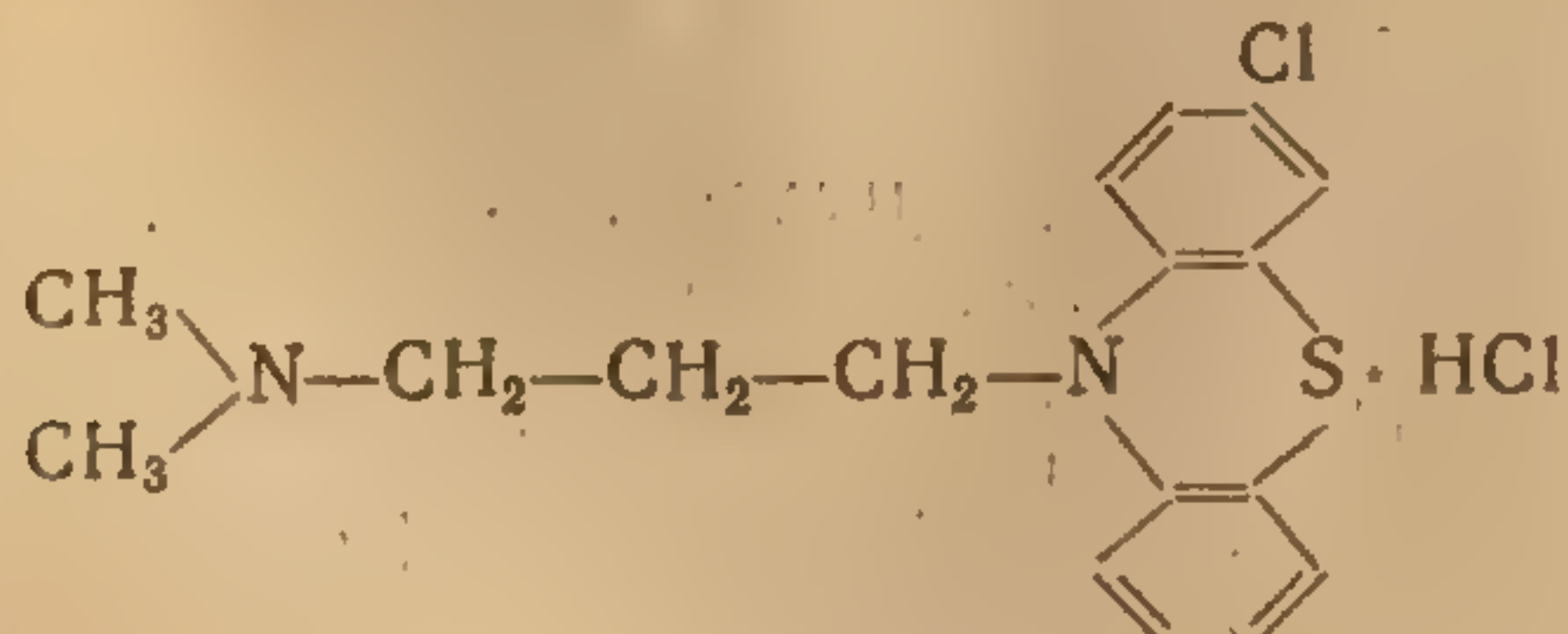
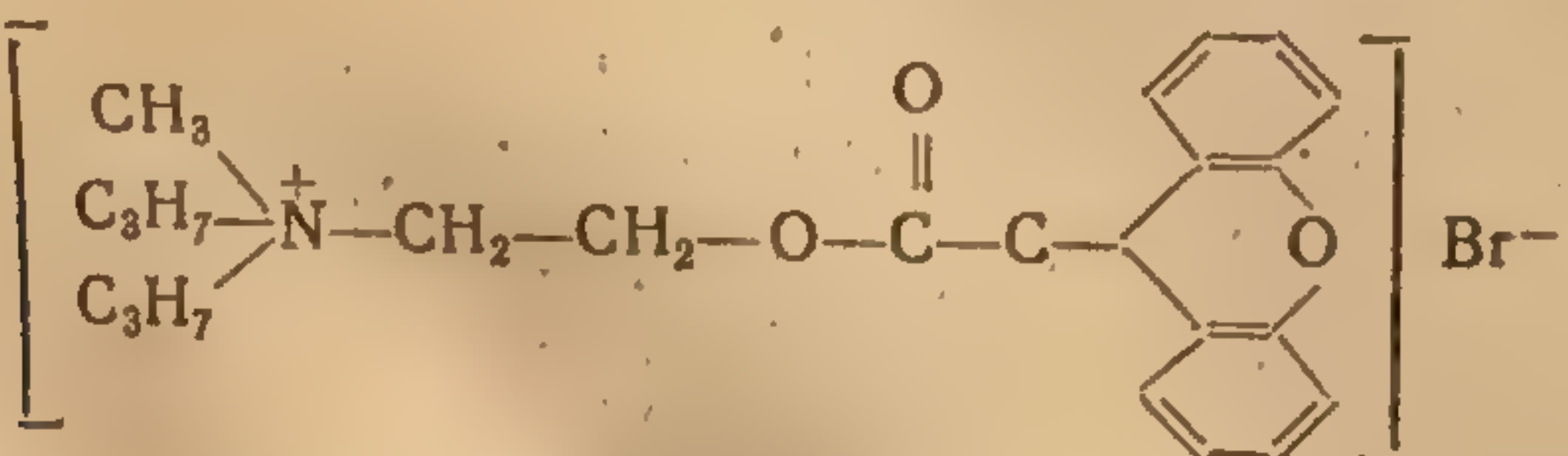


ДФФ  
Табун  
Зарин

Heymans, 1950  
Dahlbom et al., 1953  
Valdivieso, 1961  
Wills, 1956, 1961

307



Название и химическая формула холинолитика	Название ФОС	Авторы
 <p>АМИНАЗИН</p>	Смесь мала- тиона и паратиона	Frada a. Gucciardi, 1958
 <p>ПРОБАНТИН</p>	Нервные га- зы	Wilks, 1956, 1961 Valdivieso, 1961

\* В таблице перечислены только те соединения, которые в опытах на животных проявили достаточно высокую антидотную актив-  
ность.

Еш  
серно  
фекти  
вае  
при  
никот  
дае  
МСN<sub>2</sub>  
кислу  
1960)  
она  
больш  
В  
низм  
ных  
пока  
в у  
Не и  
шечн  
реак  
ми м

рептно  
ним  
вертич  
особен  
Люис  
ни э  
ТАПФ  
атропи  
тах ав  
ний с  
(160 м  
сокую  
оценке  
толон  
эстера  
шать  
но, им  
по сре  
Не  
на, ко  
дае



рентного блока. Развитие нервно-мышечного блока под влиянием ФОС можно было предупредить также некоторыми четвертичными аналогами атропина (N-бензилатропин и др.) и особенно препаратами из групп оксамидов (Kunkel et al., 1956). Люис и др. (Lewis et al., 1955) подтвердили данные в отношении эффективности *d*-тубокурарина при отравлении мышей ТЭПФ, при этом они применяли *d*-тубокурарин в комбинации с атропином. Значительно более эффективным (в 20 раз) в опытах авторов был митолон в комбинации с атропином. Последний сам по себе был неэффективен даже в высоких дозах (160 мг/кг), однако в комбинации с атропином он показал высокую антидотную эффективность уже в дозе 0,13 мг/кг. При оценке этих результатов следует, однако, иметь в виду, что митолон наряду с курареподобным действием обладает антихолинэстеразной активностью, благодаря которой он может защищать холинэстеразу от необратимого угнетения ФОС. Возможно, именно этим и объясняется его более высокая эффективность по сравнению с *d*-тубокурарином.

Нельзя целиком исключить этот механизм и у *d*-тубокурарина, который, согласно данным Тодрика (Todrick, 1954), обладает антихолинэстеразным действием.

#### *Комбинирование атропина с сернокислой магнезией*

Еще в 1946 г. было показано, что внутривенное введение сернокислой магнезии (800 мг/кг), будучи само по себе неэффективным, при отравлении животных ДФФ значительно усиливает антидотный эффект атропина у кроликов, но не у кошек; при этом отмечается устранение не только мускарино-, но и никотиноподобных симптомов интоксикации, чего не наблюдается при введении одного атропина (Modell, Kroop, 1946; McNamara et al., 1951). Некоторые авторы рекомендуют сернокислую магнезию для практического использования (Hauschild, 1960). Вряд ли, однако, в условиях оказания экстренной помощи она будет приемлема (необходимость внутривенного введения больших количеств раствора магнезии).

Вначале эффект магнезии объясняли конкурентным антагонизмом с действием антихолинэстераз в области нервно-мышечных синапсов. Однако Хуттер и Костиал (Hutter, Kostial, 1953) показали, что механизм действия ионов магнезии состоит также в уменьшении выхода ацетилхолина из нервных окончаний. Не исключена возможность, что какое-то участие в нервно-мышечном эффекте ионов магнезии при отравлении ФОС играет реактивация холинэстеразы, которая может быть ускорена ионами магнезии (Hobbiger, 1951).



### Комбинирование атропина с ганглиоблокаторами

Возможность усиления антидотного эффекта атропина за счет осуществления антагонизма в области ганглионарных синапсов была изучена Парксом и Сакра (Parkes, Sacra, 1954), Де Кандолем и Мак-Файлом (DeCandol, McPhail, 1954) и другими авторами.

При подкожном введении мышам гексония в дозе 40 мг/кг за несколько минут до отравления ЛД<sub>50</sub> ТЭПФ повышается примерно в 3 раза, Ro3-0412 — в 6 раз и Ro3-0422 — в 4 раза.

При отравлении мышей, кошек и кроликов фосфаколом пентаметоний заметно усиливал антидотный эффект атропина. Комбинация атропина с пентаметонием была подробно исследована Де Кандолем и Мак-Файлом в опытах с зарином на различных животных, в том числе и обезьянах.

Результаты были обнадеживающие; однако часть животных все же погибла в отдаленные сроки (в течение ближайшей недели).

В опытах К. А. Вятчанникова (1958) гексоний в дозах 5—30 мг/кг полностью предупреждал гибель мышей от отравления смертельной дозой октаметила. Защитное действие гексония при отравлении тетраэтилдитиофосфатом описано также в работе А. Е. Диденко (1961). Во всех рассмотренных примерах ганглиоблокирующие вещества вводились за 5—10 мин до отравления. Наиболее эффективным их применение было в случае совместного введения с атропином и другими холинолитиками (в опытах А. Е. Диденко — с апрофеном).

Усиление антидотного эффекта атропина под влиянием гексония и пентония находит объяснение в их ганглиоблокирующем эффекте; но в последнее время появились данные, указывающие на возможность защиты холинэстеразы этими соединениями от необратимого угнетения ФОС (Liska, Haszokova, 1958).

Ганглиоблокирующие свойства пахикарпина для усиления антидотного действия атропина были с положительными результатами использованы К. А. Вятчанниковым (1958, 1959). В его опытах пахикарпин совместно с атропином вводился мышам за 10 мин до отравления изосистоксом и препаратом 74. Антидотный эффект бускопана при отравлении паратионом, метилпаратиионом и систоксом у крыс, по-видимому, также связан с его ганглиоблокирующими свойствами (Deichmann, Rokoszy, 1953). Ю. С. Каган (1961) сообщает об усилении антидотного действия пентафена при добавлении к нему мерпанита, обладающего ганглиоблокирующим действием.

Исходя из данных о том, что курареподобные вещества и ганглиоблокаторы усиливают защитное действие атропина при отравлении ФОС, были испытаны комбинации, включающие все три типа холинолитиков. При этом было установлено, что такие



«тройные» комбинации эффективнее «двойных». Независимо от состава смеси, во всех случаях основным антидотом был атропин, а Н-холинолитики являлись дополнительными средствами (Heath, 1961).

### *Комбинирование атропина с М-холинолитиками*

Стремление усилить центральные антагонистические эффекты атропина по отношению к антихолинэстеразным веществам повлекло за собой попытки использовать в качестве добавок к атропину другие холинолитические вещества, отличающиеся большей избирательностью как в отношении центральных, так и периферических М-холинореактивных систем.

Комбинирование атропина с различными третичными холинолитиками приводит к усилению антидотного эффекта комбинации. Ю. И. Лисункин (1961) исследовал комбинированное действие атропина со следующими холинолитиками: тропацином, спазмолитином, тропиновым эфиром бензиловой кислоты, амизилом и пентафеном при отравлении мышей фосфаколом. Во многих комбинациях автор обнаружил синергизм типа потенцирования, но сильнее всего он был выражен в случае использования амизила, обладающего наиболее выраженным центральным действием. Уилс (Wills, 1961) провел сравнительное исследование эффективности большой серии (51 препарат) холинолитиков в отношении потенцирования антидотного действия атропина (2 мг/кг) при отравлении кроликов заринном (60 γ/кг). Среди холинолитиков, обладающих наиболее выраженным потенцирующим эффектом, были аминоспирты и производные фенотиазина с выраженными центральными холинолитическими свойствами. Однако усиление эффективности происходит, видимо, не только в отношении центрального действия атропина, но распространяется и на периферические эффекты. Это видно из того, что в опытах того же Уилса усиление антидотной активности атропина было достигнуто и в случае применения холинолитиков преимущественно периферического действия (четвертичные аналоги исследованных аминоспиртов и производных фенотиазина).

Из всего вышеизложенного видно, что принцип антагонистических отношений между холинолитическими препаратами и ФОС нашел широкое применение в работах по экспериментальной терапии. Применение атропина и подобных ему веществ подтвердило необходимость использования для лечения поражений ФОС препаратов, блокирующих М-холинореактивные системы. Введение в круг антидотов ФОС амиазина и других препаратов, обладающих выраженным центральным холинолитическим действием, показало, что для достижения более полного антагонизма с ФОС целесообразно применение веществ,



блокирующих не только М-, но и Н-холинореактивные системы мозга. Наконец, использование ганглиоблокирующих и курареподобных препаратов показало важность осуществления антагонизма между ФОС и антидотом на уровне ганглионарных и нервно-мышечных синапсов. Иными словами, экспериментальная терапия поражений ФОС охватывает все известные виды антагонизма между холинолитическими препаратами и ФОС в их действии на центральные и периферические холинергические синапсы.

### *Комбинирование атропина с местноанестезирующими веществами*

Новокаин и многие местные анестетики являются структурными аналогами ацетилхолина. Некоторые авторы на этом основании склонны рассматривать новокаин как антиметаболит ацетилхолина и рекомендуют комбинировать его с атропином.

Представляют также интерес данные о том, что у многих холинолитиков отмечены местноанестезирующие свойства, причем в отдельных группах соединений между этими свойствами имеется параллелизм (Н. Е. Акопян и В. М. Самвелян, 1958). В то же время в другой серии местных анестетиков был найден параллелизм между местноанестезирующим эффектом и угнетением холинэстеразы (Kalow, Maykut, 1956).

Установлено, что новокаин препятствует действию на ганглии ацетилхолина, эзерина, ДФФ (Atanackovic et al., 1951), устраняет бронхоспазм, вызванный ацетилхолином и, в меньшей степени, пилокарпином, эзерином и прозерином (Bhattacharia, Atanackovic, 1956).

### *РЕАКТИВИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ*

Основанием для применения реактиваторов холинэстеразы в качестве антидотов ФОС прежде всего послужили данные о том, что эти вещества обладают способностью реактивировать холинэстеразу не только *in vitro* (подробнее об этом см. стр. 133), но и *in vivo* в организме животных, отравленных ФОС. Эта способность была изучена у разных оксимов (2ПАМ, ТМБ-4, МИНА, ДИНА и др.) и при отравлении животных различными ФОС — ТЭПФ, зарин, фосфакол, ДФФ, паратион, шрад и др. (Kewitz, 1957; Hobbiger, 1957; Kewitz, Nachmansohn, 1957; Namba, Hiraki, 1958; Rutland, 1958; Hobbiger, Sadler, 1959). Некоторые из этих данных представлены в табл. 39. Из таблицы видно, что эффективность реактиваторов в опытах *in vivo* зависит от многих факторов. В первую очередь имеет значение природа ФОС и реактиватора, но очень важен также вид животного и характер ткани.



Таблица 39

## Реактивация холинэстеразы (по данным разных авторов)

Объект исследования	Ингибитор	Ткань	Реактиватор	Доза (мг/кг)	Продолжительность действия реактиватора	% реактивации
Человек	Паратнон »	Эритроциты Плазма	2ПАМ 2ПАМ	15 15	20 мин 20 »	95 40
Мышь	Фосфакол	Эритроциты	2ПАМ	25	2 ч	43
	»	Диафрагма	2ПАМ	25	1 день	22
	»	Мозг	2ПАМ	25	1 »	1
	ТЭПФ	Эритроциты	ТМБ-4	4	3 ч	39
	ДФФ	Диафрагма	2ПАМ	25	7 »	20
	»	Мозг	2ПАМ	2 × 75	2 дня	0
	Шрадан	Диафрагма	2ПАМ	2 × 50	1 день	0
Кролик	Паратнон	Эритроциты	2ПАМ	10 × 15	12 ч	60
Крыса	Зарин	Эритроциты	МИНА	35	1 ч	20
	»	Плазма	»	35	1 »	21
	»	Мозг	»	35	2 »	25
	»	Эритроциты	ДАМ	150	2 »	31
	»	Мозг	»	150	2 »	9
	»	Эритроциты	2ПАМ	100	1 »	32
	»	Скелетная мышца	2ПАМ	100	1 »	51
	»	Мозг	2ПАМ	100	1 »	3



Зависимость эффективности реактивации от строения яда характеризовалась теми же закономерностями, что и в опытах *in vitro*. При отравлении мышей разными ФОС, дающими диэтоксифосфорилированный фермент, реактивация холинэстеразы крови происходила с одинаковой скоростью (данные не приведены в таблице). После отравления фосфаколом, ТЭПФ или заринном реактивация протекала лучше, чем после отравления ДФФ, что легко объяснить более трудным восстановлением активности диизопропоксифосфорилфермента. При отравлении шраданом реактивация совсем не происходила. Сравнение действия разных реактиваторов показало, что (как и в опытах *in vitro*) наибольшей активностью обладает ТМБ-4, за ним следует 2ПАМ, потом МИНА и на последнем месте стоит ДАМ. Очень важной особенностью реактивации *in vivo* является то обстоятельство, что реактиваторы, имеющие катионную структуру (а к ним как раз относятся наиболее эффективные соединения: 2ПАМ и ТМБ-4), не способны проникать через гемато-энцефалический барьер и поэтому почти не реактивируют холинэстеразу мозга.

Необходимо, правда, отметить, что это положение не может считаться абсолютным. В очень тщательно проведенных исследованиях Розенберг (Rosenberg, 1960) показал, что если у крыс, отравленных фосфаколом, перед гомогенизацией ткани при определении активности холинэстеразы производить экстрагирование ткани хлороформом для удаления избытка свободного ингибитора, то удастся показать, что введение 2ПАМ в обычных дозах вызывает выраженную реактивацию фермента во всех отделах мозга. Это свидетельствует о том, что некоторое количество катионного реактиватора все же может проникать через гемато-энцефалический барьер.

Далее оказалось, что реактиваторы холинэстеразы восстанавливают не только активность фермента, но и функцию органа, нарушенную в результате воздействия ФОС. Так, Рой и Куперман (Roy, Kuperman, 1955) на изолированном предсердии, обработанном ТЭПФ, показали, что введение в перфузионную жидкость никотингидроксамовой кислоты приводит к реактивированию холинэстеразы и параллельно этому восстанавливается нарушенная функция.

По данным Холмса и Робинса (Holmes, Robins, 1955), нервно-мышечный блок, вызванный нанесением ДФФ, ТЭПФ или зарины на нервно-мышечный препарат крысиной диафрагмы, может быть быстро снят обработкой препарата моно- или диизонитрозоацетоном. Это действие оксимов было специфичным, так как они не снимали блокады, вызванной d-тубокурарином, сукцинилхолином или декаметонием. Ближайший аналог 2ПАМ N-метилпиридиний-2-альдоксимметансульфонат (2ПАС) в сравнительно низких концентрациях (около  $1 \cdot 10^{-5}$  М) на таком же



препарате снимал нервно-мышечный блок, вызванный не только заринном, но и некоторыми производными фосфорилтнохолина (Sundwall, 1961). Этот же автор в опытах на наркотизированных кошках показал, что нервно-мышечный блок, брадикардия, снижение кровяного давления и угнетение дыхания, вызванные метилизопропоксифосфорилтнохолином, снимаются 2ПАС, когда его концентрация в крови составляет 4  $\gamma$ /мл.

Ю. Г. Федорчук (1957) показал, что нервное проведение в верхнем шейном симпатическом ганглии кошек, нарушенное введением фосфакола, легко восстанавливается под влиянием реактиваторов холинэстеразы.

Первая попытка использовать реактиваторы холинэстеразы в качестве антидотов ФОС относится к 1955 г., когда Функе и др. (Funke et al., 1955) применили гидроксамовые кислоты для профилактики и лечения мышей, отравленных ДФФ. Среди многих исследованных ими соединений наилучший эффект давало четвертичное аммониевое производное м-диметиламинобензоилгидроксамовой кислоты. Это вещество в дозе 250 мг/кг (очень близкой к ЛД<sub>50</sub>) при введении за 15 мин до яда предотвращало гибель 93% мышей, получивших подкожно 6 мг/кг ДФФ (1,5 ЛД<sub>84</sub>). При введении реактиватора через 15 мин после яда выживало только 10% животных. Выживаемость в этих условиях могла быть повышена до 60%, если к реактиватору добавлялся атропин (5 мг/кг).

Очень небольшой, но достоверный антидотный эффект был продемонстрирован для никотингидроксамовой кислоты при отравлении мышей заринном (Epstein, Freeman, 1956). В дальнейшем было установлено, что оксимы являются значительно более эффективными реактиваторами холинэстеразы, чем гидроксамовые кислоты. Поэтому все исследования антидотных свойств реактиваторов, выполненные в последнее время, относятся почти исключительно к оксимам. Наиболее распространенным объектом этих исследований были: пиридин-2-альдоксимметйодид (2ПАМ), моноизонитрозоацетон (МИНА), диацетилмонооксим (ДАМ) и ТМБ-4.

Уже первые работы показали, что антидотный эффект оксимов в очень большой степени зависит от характера примененного яда и от вида подопытного животного. Так, 2ПАМ в дозе 75 мг/кг предотвращал гибель всех мышей, отравленных смертельной дозой фосфакола (Kewitz, Wilson, 1956), но совершенно не защищал мышей от отравления заринном (Dultz et al., 1957; Loomis, 1956). Вильсон (Wilson, 1957) изучал эффект 2ПАМ при отравлении мышей различными ФОС. Он показал, что в дозе 90 мг/кг 2ПАМ защищает 100% мышей от ЛД<sub>100</sub> ТЭПФ, но не действует при введении удвоенной смертельной дозы этого яда. Очень слабый, но отчетливый эффект был получен при отравлении табуном, а при введении зарина и паратиона 2ПАМ



почти не оказывал действия. Совершенно не эффективным 2ПАМ оказался при отравлении и шраданом — октаметилом (Kewitz, 1957).

В опытах на крысах было установлено (Askew, 1956), что МИНА и ДАМ оказывают значительно менее выраженный эффект при отравлении ТЭПФ и ДФФ, чем при воздействии заринном.

По данным Милошевича и др. (Milosevic et al., 1959, 1960), ТМБ-4 и 2ПАМ хорошо защищают мышей, отравленных параксоном, паратионом и метасистоксом; действуют несколько хуже при отравлении димефоксом и диптерексом и совсем не спасают животных, отравленных шраданом.

Способность оксимов оказывать антидотное действие на разных видах животных была исследована Эскью (Askew, 1956) на примере ДАМ. Оксим в дозе 150 мг/кг вводили за 15 мин до зарина. В каждом случае определяли величину ЛД<sub>50</sub> яда и сравнивали ее с той же величиной у контрольных животных. Было показано, что ДАМ увеличивает ЛД<sub>50</sub> зарина для крыс в 26,5 раза, для мышей — в 1,7 раза, для морских свинок — в 2 раза, для кроликов — в 1,6 раза, для обезьян (1 опыт) — в 3 раза. Аналогичные данные получили Дульц и др. (Dultz et al., 1957), которые установили, что ДАМ в дозе 200 мг/кг защищает мышей от двух, а крыс от 15 ЛД<sub>50</sub> зарина.

Таким образом, отчетливый профилактический эффект при отравлении заринном ДАМ оказывал только у крыс.

ТМБ-4 при профилактическом введении мышам в дозе 95  $\mu$ моль/кг увеличивал ЛД<sub>50</sub> ДФФ в 6 раз, а ЛД<sub>50</sub> ТЭПФ в 21 раз. 2ПАМ в этих же условиях никакого эффекта не оказывал (Hobbiger, Salder, 1959). Отчетливое преимущество ТМБ-4 перед 2ПАМ было показано и при профилактике отравлений мышей системным инсектицидом фосфамидоном. ТМБ-4 обладал в 5,7 раза более выраженным защитным эффектом, чем 2ПАМ (Milosevic et al., 1961). Сравнительное изучение профилактического действия ТМБ-4 и 2ПАМ при отравлении мышей холинсодержащим ФОС (диэтоксифосфорилтиохолин) провели Леман и др. (Lehman et al., 1960). При введении реактиваторов внутрибрюшинно в дозе 0,5 ЛД<sub>50</sub> для каждого 2ПАМ повышал ЛД<sub>50</sub> яда в 50 раз, а ТМБ-4 — в 280 раз. При пероральном введении реактиваторов различие было еще более выражено: 2ПАМ повышал дозу яда в 23 раза, а ТМБ-4 — в 450 раз.

Биненфельд и сотр. (Binenfeld, Vojvodic, 1961; Binenfeld et al., 1961) приготовили из 2ПАМ и ТМБ-4 их хлористые аналоги, которые обладали таким же защитным эффектом, как исходные вещества, но были лучше растворимы в воде.

Подытоживая приведенные данные об антидотном действии реактиваторов холинэстеразы, необходимо признать, что более или менее выраженный эффект может быть достигнут только

при профи-  
зываемое  
дло оксим  
дения яда  
введения,  
шины, окс  
одновремен

При на  
знаков отр  
раниченны  
удавалось

Оживле  
подвергает  
большинст  
оксимов с  
ванной ФС  
ходит восс  
ферментат  
цесса хими  
оксими ра  
в действии

Вместе  
существов  
авторами  
ной актив  
линэстера  
Rutland, 1  
тидотные  
оксимов, п  
И наобор  
2ПАМ об  
щать гибе

Выше  
ровать уг  
реагирова  
продукты  
(Jandorf  
ность раз  
и объясня  
как пока  
ветствия  
быстро ре  
В то же  
при отра  
женной п  
Было  
дотные с



при профилактическом введении вещества. Испытывая так называемое лечебное действие, большинство исследователей вводило оксим внутривенно через 1 мин после подкожного введения яда. Совершенно естественно, что при таких условиях введения, благодаря быстрому всасыванию из полости брюшины, оксим накапливается в крови если не раньше, чем яд, то одновременно с ним.

При настоящем лечебном применении (на фоне явных признаков отравления заринном) МИНА и ДАМ давали весьма ограниченный эффект: при отравлении заринном в удвоенной ЛД<sub>50</sub> удавалось спасти лишь часть животных (Askew, 1956).

Оживленному обсуждению в литературе последнего времени подвергается вопрос о механизме действия оксимов. По мнению большинства исследователей, сущность антидотного действия оксимов сводится к реактивированию холинэстеразы, блокированной ФОС. В результате этого специфического влияния происходит восстановление активности холинэстеразы, возобновление ферментативного гидролиза ацетилхолина и нормализация процесса химической передачи нервных импульсов. Таким образом, оксимы рассматриваются как специфические антагонисты ФОС в действии на холинэстеразу.

Вместе с тем, в литературе имеются данные, допускающие существование других механизмов действия оксимов. Многими авторами было отмечено, что нет параллелизма между антидотной активностью оксимов и их способностью реактивировать холинэстеразу (Askew, 1956; Askew et al., 1957; Hobbiger, 1957; Rutland, 1957; Crook et al., 1962). Так, оказалось, что ДАМ, антидотные свойства которого выражены больше, чем у других оксимов, почти совершенно лишен реактивирующей способности. И наоборот, один из лучших реактиваторов холинэстеразы — 2ПАМ обладает лишь ограниченной способностью предотвращать гибель животных, отравленных ФОС.

Выше отмечалось, что оксимы, кроме способности реактивировать угнетенную холинэстеразу, обладают свойством быстро реагировать с ФОС, в результате чего образуются нетоксичные продукты гидролиза. По мнению некоторых исследователей (Jandorf et al., 1955a; Hackley et al., 1955), именно эта способность разрушать ФОС до того, как они проявят свое действие, и объясняет профилактический эффект оксимов. Однако и здесь, как показали сравнительные исследования, нет полного соответствия (Askew et al., 1957). Так, МИНА и 2ПАМ одинаково быстро реагируют с заринном, а ДАМ — значительно медленнее. В то же время 2ПАМ совершенно неэффективен как антидот при отравлении этим ядом, а ДАМ и МИНА обладают выраженной профилактической активностью.

Было высказано предположение, что незначительные антидотные свойства 2ПАМ связаны с тем, что это соединение, яв-



ляющееся четвертичным аммониевым производным, плохо проникает в центральную нервную систему и, следовательно, не может накопиться в достаточной для проявления антидотного действия концентрации именно в том месте, где разыгрываются основные патологические процессы, особенно при отравлении зарином. С целью устранить этот недостаток Вильсон (Wilson, 1958) синтезировал и исследовал гомолог 2ПАМ — пиридин-2-альдоксимдодецилйодид (ПАД). Идея этого синтеза состояла в том, что введение в молекулу пиридинальдоксима длинного углеводородного радикала значительно повысит липидофильность соединения и, несмотря на сохранение заряда при атоме азота, придаст этому соединению более выраженную способность проникать через гемато-энцефалический барьер. Было установлено, что ПАД в отличие от 2ПАМ растворяется в хлороформе значительно лучше, чем в воде. По способности *in vitro* реактивировать холинэстеразу, угнетенную ТЭПФ, ПАД оказался в 3 раза менее эффективным, чем 2ПАМ. Оба вещества с одинаковой скоростью вступали в прямую реакцию с зарином. И несмотря на это, ПАД оказался достоверно, хотя и незначительно, более активным антидотом. Особенно отчетливо антидотное действие ПАД проявлялось при совместном применении обоих веществ в комбинации с атропином. Так (в опытах на мышах, отравленных зарином), замена небольшой части дозы 2ПАМ эквимолекулярным количеством ПАД увеличивала антидотную мощность смеси почти в 2 раза. Из этих опытов вытекает, что способность оксимов проникать в центральную нервную систему имеет несомненное значение для проявления их антидотных свойств.

Создать у четвертичных оксимов центральный эффект можно и другим способом: вводить их непосредственно в мозг, минуя гемато-энцефалический барьер. Разумеется, этот способ почти не имеет практического значения, но он интересен в теоретическом отношении. Такая попытка была предпринята в последнее время (Tong, Way, 1962). Оказалось, что внутричерепное введение 2ПАМ мышам почти не дает защитного эффекта при отравлении ТЭПФ, фосфаколом и ДФФ, однако при комбинации внутричерепного и внутрибрюшинного введения эффект был выражен достаточно четко: ЛД<sub>50</sub> ядов возрастала в 3—6 раз. Еще выше был эффект, когда оба эти пути введения 2ПАМ сочетались с внутрибрюшинной инъекцией атропина: ЛД<sub>50</sub> фосфакола при этом возрастала в 24 раза.

Совершенно очевидно, что значение способности оксимов проникать в мозг в очень большой степени зависит от того, каким ядом было отравлено животное. Выше уже цитировалась работа Лемана (Lehman et al., 1960), в которой было показано, что 2ПАМ и, особенно, ТМБ-4 обладают исключительно высоким профилактическим эффектом при отравлении одним из

производ-  
тем, что  
аммоние  
нервную  
низм ме  
В тех же  
ным дей  
обладали

Стрем  
реактива  
совместн  
достаточ  
антагони  
и др. (К  
шение а  
оксимов  
которые са  
действие  
тивен пр  
щей дозо  
дении ле  
вается в  
шей степ  
В опыта  
МИНА  
целый с  
фект — у

Бете  
ность П  
уретаном  
Мерой т  
наступле  
предвар  
увеличи  
фосфакс

В оп  
(50 мк/  
32 раза,  
ger, 195  
вместно  
отравлен  
Войводи  
рованно  
у живот  
ческом  
лечебно  
ляет не



производных фосфорилхолина. Этот эффект легко объяснить тем, что как яд, так и реактиватор являются четвертичными аммониевыми соединениями и плохо проникают в центральную нервную систему. Поэтому и картина интоксикации, и антагонизм между ФОС и антидотом разыгрываются на периферии. В тех же случаях, где применялся яд с выраженным центральным действием (зарин, фосфакол и др.), 2ПАМ и даже ТМБ-4 обладали очень слабым защитным эффектом.

Стремление «исправить» недостаточное центральное действие реактиваторов, имеющих катионную структуру, привело к идее совместного применения их с холинолитиками, обладающими достаточно выраженным центральным влиянием и способными антагонизировать с ФОС в центральной нервной системе. Кевитц и др. (Kewitz et al., 1956, 1957) получили значительное повышение антидотной активности при комбинированном введении оксимов и атропина, причем атропин применялся в дозах, которые сами по себе никаким лечебным или профилактическим действием не обладали. Так, 2ПАМ, который почти не эффективен при отравлении крыс заринном, в сочетании с недействующей дозой атропина превращается в мощный антидот (при введении лечебной смеси за 15 мин до яда ЛД<sub>50</sub> зарина увеличивается в 13,8 раза). Потенцирующее действие атропина в меньшей степени выражено для МИНА и еще меньше для ДАМ. В опытах на обезьянах было установлено, что в сочетании с МИНА атропин в дозе 0,029 мг/кг (что эквивалентно 2 мг на целый организм человека) оказывает ясно выраженный эффект — увеличение ЛД<sub>50</sub> зарина в 14 раз (Askew, 1957).

Бете и др. (Bethe et al., 1957) исследовали антидотную мощность ПАМ на морских свинках. Животных наркотизировали уретаном и медленно внутривенно вливали им раствор ФОС. Мерой токсичности служила общая доза яда, необходимая для наступления гибели животного. При отравлении свинок ДФФ предварительное комбинированное введение атропина и ПАМ увеличивало смертельную дозу яда в 20 раз, а при отравлении фосфаколом — в 190 раз.

В опытах на мышах комбинированное введение атропина (50 мкг/кг) и 2ПАМ (20 мг/кг) увеличивало ЛД<sub>50</sub> ТЭПФ в 32 раза, ДФФ — в 16—32 раза, фосфакола — в 128 раз (Hobberger, 1957). Отчетливое повышение защитного действия при совместном применении 2ПАС и атропина наблюдалось у собак, отравленных парами зарина (Crook и др., 1962). По данным Войводица и Биненфельда (Vojvodic, Binenfeld, 1962), комбинированное применение 2ПАМ или ТМБ-4 совместно с атропином у животных, отравленных армином, оказывает при профилактическом введении гораздо более выраженный эффект, чем при лечебном. Дальнейшее развитие этих исследований представляет несомненный интерес.



Возможность применения реактиваторов холинэстеразы в качестве антидотов в значительной мере ограничивается тем, что многие из них обладают сравнительно высокой токсичностью. Данные о токсичности наиболее распространенных реактиваторов представлены в табл. 40. По данным Эскью (Askew, 1956), максимальная доза оксимов, не вызывающая признаков отравления, составляет: для ДАМ — 150 мг/кг, для ПАМ — 100 мг/кг, для МИНА — 30 мг/кг, а для диизонитроацетона — 13 мг/кг. В указанных дозах эти соединения проявляют лишь ограниченный антидотный эффект. Поэтому были предприняты попытки выяснить природу токсичности оксимов и разработать методы, обеспечивающие возможность безопасного введения животным больших доз этих веществ. Было замечено, что клиническая картина отравления животных МИНА и диизонитроацетоном настолько напоминает явления интоксикации синильной кислотой, что эти две формы патологии не всегда удается различить. Исходя из того, что 2-оксооксимы могут разрушаться в организме с образованием цианидов, было высказано предположение, что причиной токсичности этих оксимов является накопление синильной кислоты в организме. Это предположение было подтверждено экспериментально. Эскью и сотр. (Askew et al., 1956) показали, что в выдыхаемом воздухе собак, отравленных МИНА и диизонитроацетоном, содержится синильная кислота. После отравления крыс МИНА в дозе 150 мг/кг плазма крови обладала способностью угнетать активность цитохромоксидазы так же выражено, как плазма животных, получивших 12 мг/кг цианида калия. Наличие цианидов в плазме животных, отравленных МИНА, было доказано прямыми химическими определениями. Явления интоксикации МИНА удавалось предотвратить профилактическим введением смеси нитрита и тиосульфата. Введение ДАМ, в отличие от МИНА и диизонитроацетона, не сопровождалось накоплением цианидов в организме. Токсичность 2ПАС тоже не могла быть объяснена образованием цианидов или превращением 2ПАС в N-метилпиридиний-2-нитрил (Enander et al., 1961 а, б).

Таблица 40

**Токсичность реактиваторов холинэстеразы для мышей**  
(внутрибрюшинное введение)

Соединение	ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)	Автор
2ПАМ	260	Hobbiger, Sadler (1959) Он же Dultz et al., 1957 Он же » »
ТМБ-4	130	
МИНА	150	
ДИНА	20	
ДАМ	900	

Выде  
шалось  
амидом  
С цо  
динальд  
вводи  
тивные  
щества  
моче б  
N-метил  
вая кис

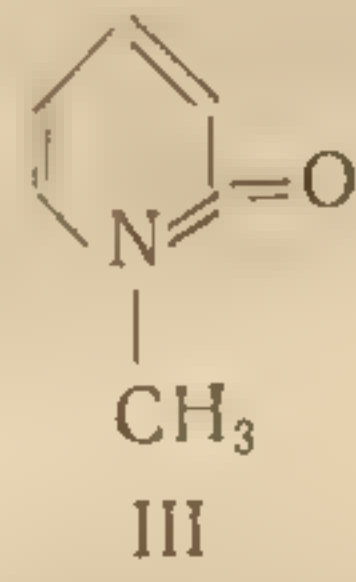
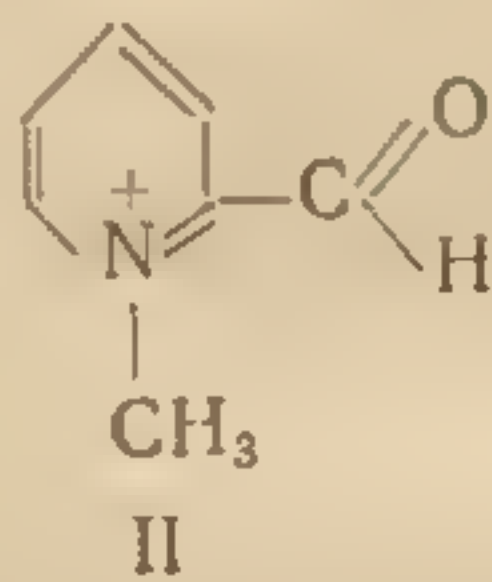
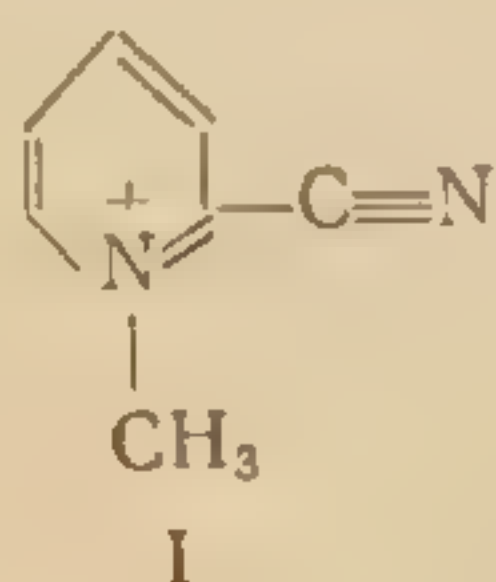
Посл  
мененн  
ствами.  
высказа  
водное  
Дал  
активат  
и живо  
соедине  
странен  
ции ФС  
Хор  
ваторов  
рах Г.

ЗАЩИТ  
Кос  
рина (о  
ДФФ.  
действи  
животн  
дился  
против  
фекта  
Эзе  
гим не  
тиофат



Выделение 2ПАС у собак усиливалось при ацидозе и уменьшалось при алкалозе, вызванном бикарбонатом, но не ацетазоламидом (Berglund et al., 1962).

С целью более точного изучения путей превращения пириминальдоксима в организме Энандер и др. (Enander et al., 1962) вводили крысам 2ПАМ, меченный  $C^{14}$ , и исследовали радиоактивные метаболиты, выделяющиеся с мочой. Большая часть вещества выделялась в неизмененном виде, но наряду с этим в моче были обнаружены некоторые продукты обмена 2ПАМ: N-метилпиридиний-2-нитрил (I), N-метилпиридиний-2-карбоновая кислота (II) и N-метил-2-пиридон (III).



После введения 2ПАМ человеку из мочи был выделен неизмененный 2ПАМ и метаболит, обладающий кислотными свойствами. На основании изучения свойств этого вещества было высказано предположение, что оно представляет собой производное N-метилпикколиновой кислоты (Kramer, 1962).

Дальнейшее изучение механизма токсического действия реактиваторов холинэстеразы и их обмена в организме человека и животных представляется чрезвычайно важным, так как эти соединения постепенно приобретают все более широкое распространение в качестве лечебных средств для терапии интоксикации ФОС у людей.

Хорошая сводка данных о свойствах и применении реактиваторов холинэстеразы содержится в двух обстоятельных обзорах Г. А. Степанского (1958, 1961).

#### ЗАЩИТА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ОТ НЕОБРАТИМОГО УГНЕТЕНИЯ ФОС

Костер (Koster) в 1946 г. показал, что небольшие дозы эзерина (0,01 мг/кг) защищают кошек от смертельного отравления ДФФ. Значительно более эффективным оказалось совместное действие эзерина и атропина; после введения такой комбинации животные переносили 30-кратную ЛД<sub>50</sub> ДФФ. Если эзерин вводился на фоне уже развившейся интоксикации, то наблюдался противоположный результат — потенцирование токсического эффекта ДФФ.

Эзерин отчетливо повышал выносливость животных и к другим необратимым ингибиторам холинэстеразы — например, эонофату (фосфолину). Это наглядно видно из табл. 41.



Таблица 4.

Синергизм и антагонизм между антихолинэстеразными веществами  
при субкюнктивальном введении  
(Krishna. Leopold, 1960)

Антихолинэстеразное вещество и концентрация (в %)		Время наступления смерти после второй инъекции (в мин)
1-я инъекция	2-я инъекция *	
Демекарин 0,5	Эзерин 1,0	3,5
Эзерин 1,0	Демекарин 0,5	4,5
Экотиофат 0,5	Эзерин 1,0	4,5
Эзерин 1,0	Экотиофат 0,5	34
ДФФ 0,1	Эзерин 1,0	4,5
Эзерин	ДФФ 0,1	105

\* Вторая инъекция через 5 мин после первой.

Эти, на первый взгляд, парадоксальные результаты объясняются существованием конкурентного антагонизма между обратимыми (эзерин) и необратимыми (ДФФ, экотиофат) ингибиторами холинэстеразы. В случае предварительного введения эзерина происходит временное блокирование холинэстеразы, которое защищает ее от последующего необратимого угнетения.

При обратном порядке, когда эзерин вводится в период уже наступившего необратимого угнетения холинэстеразы, этот защитный эффект, естественно, проявиться не может и, напротив, наблюдается потенцирование токсичности.

В дальнейшем феномен конкурентного блока холинэстеразы эзеринном был показан и на других примерах. Дю Буа и сотр. (Du Bois et al., 1950, 1953) предварительной инъекцией эзерина и атропина удалось увеличить ЛД<sub>50</sub> диэтилбис (диметиламида) пирогосфата и октаметила в 11 раз, в то время как один атропин давал увеличение ЛД<sub>50</sub> только в 4—5 раз. Близкий результат получили Салерно и Кун (Salerno, Coop, 1950) в опытах с паратионом. Менее выраженное, но достоверное защитное действие эзерина было отмечено Вильгельми и Доменъцем (Wilhelmi, Domenjoz, 1951).

В последующем было установлено, что аналогичным действием обладает и прозерин. Так, по данным Х. Г. Чичина (1962), прозерин при предварительном введении мышам снижает токсичность октаметила в 3,7 раза, в то время как эзерин, напротив, более эффективным был эзерин.

В 1954 г. (а)  
водородов (а)  
равления пар  
рин в дозе  
хлордан (20  
2,5 раза. Бы  
ностью этих  
вследствие ч  
конкурирует  
рое количест  
окончательно  
торого повы  
собой алиэст  
разой, то, в  
поэтому мож  
том — напри  
О связи с я  
торой при в  
животного  
ты, которые  
холинэстера  
ляется мал

В отнош  
эстеразы, т  
свойства т  
синтез», по  
обезврежив  
ментов, от  
токсичност  
что актив  
SKF-525A.  
ной кислот  
рующему  
синтезе» с  
20 мг/кг)  
этом авто  
свойств S  
литину и  
антидотны  
ядами.

Интер  
зять дето  
свидетель  
тила и де



## УСКОРЕНИЕ ГИДРОЛИЗА ФОС

В 1954 г. было показано, что введением хлорированных углеводов (алдрина и др.) можно защитить животных от отравления паратионом и ТЭПФ (Ball et al.; Crevier et al.). Алдрин в дозе 30 мг/кг увеличивал ЛД<sub>50</sub> паратиона в 7,3 раза, хлордан (200 мг/кг) — в 5,5 раза, линдан (30 мг/кг) — в 2,5 раза. Было установлено, что этот эффект связан со способностью этих соединений повышать активность алиэстеразы, вследствие чего увеличивается общий уровень эстеразы, которая конкурирует за связь с ФОС, и тем самым сохраняется некоторое количество истинной холинэстеразы. В настоящее время нет окончательной уверенности в том, что фермент, активность которого повышают хлорированные углеводороды, представляет собой алиэстеразу. Но если этот фермент и не является алиэстеразой, то, во всяком случае, он способен фосфорилироваться и поэтому может конкурировать с более жизненно важным ферментом — например, холинэстеразой эритроцитов (О'Брайен, 1960). О связи с ядом существует и другая точка зрения, согласно которой при введении хлорированных углеводов в организме животного накапливаются какие-то физиологические метаболиты, которые в свою очередь реактивируют ингибированную ФОС холинэстеразу (Neubert, Schaefer, 1958), однако это представляется маловероятным.

В отношении так называемых непрямых ингибиторов холинэстеразы, т. е. соединений, которые приобретают токсические свойства только после введения их в организм («летальный синтез», по Питерсу, — Peters, 1952), возможен особый путь обезвреживания. Он состоит в подавлении активирующих ферментов, ответственных за эти превращения, благодаря чему токсичность таких соединений будет снижена. Было показано, что активирование октаметила можно подавить препаратом SKF-525A (β-диэтиламиноэтиловый эфир дифенилпропилуксусной кислоты). Как полагают авторы, именно благодаря ингибирующему действию на ферменты, участвующие в «летальном синтезе» октаметила, им удалось при помощи SKF-525A (доза 20 мг/кг) повысить ЛД<sub>50</sub> октаметила для мышей в 4 раза. При этом авторы почему-то вовсе не учитывают холинолитических свойств SKF-525, чрезвычайно близкого по строению к спазмолитину и другим подобным эфирам, обладающим выраженным антитоксическим действием при отравлении антихолинэстеразными ядами.

Интересно, что SKF-525 обладает также способностью тормозить детоксикацию барбитуратов, что, по мнению О'Брайена, свидетельствует о близости процессов активизирования октаметила и детоксикации барбитуратов.



Если путь подавления ферментов, активирующих «летальный синтез», составляет особенность предотвращения токсического действия таких соединений, как октаметил и паратион, то для некоторых других соединений также возможны особые пути терапии, основанные не на главном патогенетическом механизме отравления, а на побочных действиях. В качестве примера можно привести отравление табуном. Учитывая вероятность участия в токсическом эффекте табуна освобождающейся в процессе его гидролиза синильной кислоты, Колеман и др. (Coleman et al., 1960) применили в качестве дополнения к обычному антидотному лечению отравлений табуном метгемоглобинообразователи и получили усиление защитного эффекта — правда, только в случае совместного применения с реактиваторами холинэстеразы.

### ПОДАВЛЕНИЕ СИНТЕЗА АЦЕТИЛХОЛИНА

Одним из возможных, но почти неизведанных путей вмешательства в нарушенный антихолинэстеразными веществами процесс нейро-гуморальной передачи является уменьшение выделения ацетилхолина в синапсах. В последнее время этот вопрос привлек внимание физиологов и фармакологов (обзор литературы см. у С. Н. Голикова и С. И. Локтионова, 1963). К числу веществ, угнетающее влияние которых на синтез и освобождение ацетилхолина можно считать доказанным, относятся производные холина — гемихолиний, однако их влияние на интоксикацию антихолинэстеразными веществами почти не изучено. Наиболее активный из гемихолиний НС-3 обладает способностью подавлять эффект антихолинэстеразных веществ на изолированные органы, хотя он не блокирует холинорецептор, не реактивирует холинэстеразу и не обладает способностью химически нейтрализовать антихолинэстеразные вещества. Аналогичное действие присуще 2, 3, 4, 5, 7-пентаоксифлавону, который получил название морины. По своим фармакологическим свойствам морин близок гемихолинию, причем установлено, что он является ингибитором холинацетилазы — фермента, необходимого для синтеза ацетилхолина в организме.

Как показали Балотин и Кун (Balotin, Coon, 1960), морин в дозе 50 мг/кг в сочетании с атропином (в неэффективной дозе) снижает токсичность ТЭПФ. Некоторое, но очень небольшое снижение токсичности авторы наблюдали и при введении одного морины. В больших дозах (600 мг/кг) морин подавлял мышечные подергивания, вызванные ТЭПФ. Кроме того, оказалось, что морин проявляет антагонизм с действием антихолинэстеразных веществ на изолированное сердце и кишку, не влияя на действие ацетилхолина. Несмотря на то, что антидотное действие морины по отношению к антихолинэстеразным веществам выра-

жено в оч  
чение в д  
тилхолина  
Влиян  
фармакол  
чаще, чем  
можном в  
ствует и  
висимо от  
свойств  
1962). Во  
можно о  
ратином  
ley, 1958  
ные диффе  
ляют инт  
не всегда  
действия  
колевой

Поск  
тение хо  
низм оч  
тором. С  
в экспе  
Шет  
холинэс  
никотин  
репах. I  
торы у  
тельнос  
блокир  
В эт  
(Besket  
трическ  
на кору  
Учи  
метабо  
сичност  
уменьш  
пользу  
сти и в  
ацетил  
стему



жено в очень умеренной степени, можно рассчитывать на получение в дальнейшем более сильных ингибиторов синтеза ацетилхолина.

Влияние веществ на синтез и освобождение ацетилхолина в фармакологической практике, по-видимому, может иметь место чаще, чем мы это подозревали. Выше уже было сказано о возможном влиянии в этом направлении ионов магния. Так же действует и новокаин (Harvey, 1939), который, по-видимому, независимо от своих местноанестезирующих и ганглиоблокирующих свойств снижает продукцию ацетилхолина (Д. А. Харкевич, 1962). Возможно, что именно этим свойством новокаина отчасти можно объяснить его защитный эффект при интоксикации паратионом, который наблюдал в опытах на мышах Конли (Conley, 1958). Имеющиеся данные о том, что некоторые производные дифенилгликоля тормозят синтез ацетилхолина, представляют интерес в том отношении, что они могут пролить свет на не всегда объяснимые эффекты потенцирования антидотного действия атропина при добавлении к нему эфиров дифенилгликолевой кислоты.

### ВОЗМЕЩЕНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Поскольку в основе патогенеза отравления ФОС лежит угнетение холинэстеразы, можно было ожидать, что введение в организм очищенного энзима явится эффективным лечебным фактором. Однако это направление не получило широкого развития в экспериментальной терапии интоксикации.

Шетц и др. (Shatz et al., 1951) при введении очищенной холинэстеразы наблюдали торможение мускариноподобных и никотиноподобных эффектов ацетилхолина у собак, кошек и черепах. В меньшей степени эффект был выражен на сердце. Авторы утверждают, что имеется соответствие между продолжительностью увеличения активности холинэстеразы в плазме и блокированием прессорных эффектов ацетилхолина.

В этом отношении интересно наблюдение Бекет и Гельгорна (Beckett, Gelhorn, 1948), которые вызывали уменьшение электрической активности коры головного мозга путем нанесения на кору очищенной панкреатической холинэстеразы.

Учитывая роль ионов калия и кальция в ацетилхолиновом метаболизме, Азар и Дельга испытали влияние кальция на токсичность ФОС. Оказалось, что хлористый кальций несколько уменьшает токсичность ДФФ. Надо полагать, что определенную пользу в ослаблении токсических эффектов ФОС может принести и введение АТФ, который тормозит возбуждающее действие ацетилхолина, прозерина и эзерина на центральную нервную систему (Jordan и др., 1950).



## ДРУГИЕ ВИДЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Исследования по экспериментальной терапии отравлений ФОС у животных не ограничиваются применением антидотов. В литературе приводятся также данные о различных приемах патогенетической и симптоматической терапии, дающих при совместном применении с антидотом положительный результат. Особенно большое значение всеми без исключения авторами придается искусственному дыханию.

Несмотря на большое многообразие симптомов отравления ФОС и вовлечение в патологический процесс различных функциональных систем, вся картина интоксикации протекает под знаком превалирования дыхательных расстройств, которые и являются непосредственной причиной смерти. Понижение возбудимости дыхательного центра, бронхоспазм, паралич дыхательной мускулатуры, наблюдаемые при отравлении смертельными дозами ФОС, — три основных фактора, определяющие абсолютную необходимость производства искусственного дыхания.

И действительно, в опытах на животных многочисленными исследователями было установлено, что под искусственным дыханием (путем вдувания воздуха в трахею) они переносят отравление несколькими смертельными дозами ФОС, а в случае введения животному антидота количество переносимых смертельных доз еще больше возрастает. Б. В. Шугаев (1957) установил, что искусственное дыхание повышает выносливость собак к алкилфосфатам в 5—7 раз. По Холмстедту (Holmstedt, 1951), токсичность табуна для кошек в опытах с искусственным дыханием уменьшается примерно в 20 раз, а с введением атропина, оказывающего в данных условиях опыта защитное действие на сердце, примерно в 60 раз. Еще более разительный эффект наблюдали Бете и сотрудники, которым удалось повысить выносливость животных к фосфаколу в 160 раз, к тиофосу — в 70 раз и кДФФ — в 20 раз применением комбинированной терапии (искусственное дыхание в сочетании с введением атропина и метйодида пиридинальдоксима), в то время как введение животным тех же препаратов, но без искусственного дыхания, позволило уменьшить токсичность ядов только в 2,6—4 раза.

В литературе имеются также сообщения о высокой эффективности кислородной терапии при интоксикации животных ФОС (М. А. Казакевич, 1954).

В итоге исследований по экспериментальной терапии тяжелых отравлений ФОС наиболее обоснованным следует считать комбинированное лечение, состоящее в раннем применении искусственного дыхания совместно со своевременным введением пострадавшему антидота и назначением средств патогенетической и симптоматической терапии по показаниям.



Вопросы симптоматической терапии отравлений ФОС разработаны недостаточно. М. А. Казакевич (1954) рекомендует для лечения интоксикаций ФОС кофеин, камфару, глюкозу и витамины.

Влияние корамина на течение интоксикации ЭФН (этил-4-нитрофенилтионобензолфосфата) у мышей подробно исследовано Розенбергом и Куном (Rosenberg, Coon, 1960). В опытах авторов корамин сам по себе оказывал защитное действие, которое усиливалось при его сочетании с атропином. Аналогичным действием обладал и никотинамид (витамин РР), являющийся продуктом метаболизма корамина (никетамида) в организме животных. Авторы установили, что защитное действие обоих препаратов не связано с вызываемыми ими изменениями содержания в тканях ДПН и ТПН. Логичнее всего было считать, что защитное действие корамина связано с его аналептическим влиянием на дыхание и кровообращение, однако сообщение авторов о том, что корамин и витамин РР в опытах *in vivo* защищают холинэстеразу крыс от инактивирующего действия ЭПН, наводит на размышления о другом механизме. В то же время остается непонятным, почему в опытах *in vitro* те же препараты не влияли на силу антихолинэстеразного действия ЭПН.

О стимулирующем влиянии на дыхание коразола при отравлении собак табуном сообщили Браун и Сомерс (Brown, Somers, 1956).

Из других направлений по экспериментальной терапии отравлений ФОС следует упомянуть о гормонотерапии. На основании данных о пониженной функции коры надпочечников при интоксикации ФОС Нинагава (Ninagawa, 1958) изучил влияние 17-оксикортикостерона и 11-дигидро-17-оксикортикостерона-21-ацетата на течение отравления паратином и дихлорвинилдиметилфосфатом. Положительный эффект автор получил только при сочетании гормонов с ЭДТА. Если вместо последнего в комбинацию вводили БАЛ, тиаминпропилдисульфид или глицеризин, то лечебного эффекта не отмечалось. Пани Антонио (Pani Antonio, 1961) описан случай тяжелого отравления человека паратином при безуспешном лечении атропином, аналептиками, сербными средствами и кислородом. После введения строфанта, аминофиллина, витаминов С и Р и повторных вливаний кортизона состояние отравленного резко улучшилось. По мнению автора, вещества типа кортизона при тяжелых состояниях интоксикации ФОС особенно показаны как противострессорные средства. Бергманом и Румбаухом (Bergman, Rumbaugh, 1959) было отмечено положительное влияние эстрадиола и инъекций крови на выздоровление крыс от отравления ДФФ, причем было отмечено ускорение восстановления активности холинэстеразы эритроцитов (но не мозга) под влиянием внутрибрюшинного введения гепаринизированной крови.



Некоторые авторы считают показанным применение противо-судорожных и наркотических средств. По мнению Б. Б. Шугаева (1957), тиопентал в наркотических дозах значительно увеличивает эффективность атропина при отравлении собак ФОС. Интересно, что применение одного тиопентала без антидота не только не оказывало защитного действия, но даже снижало выносливость животных к яду. Следовательно, назначение тиопентала, а возможно, и других наркотических средств является противопоказанным в тех случаях, когда пострадавшему еще не введен антидот.

По мнению других авторов, барбитураты только ослабляют судороги при отравлении ФОС, но отчетливо не влияют на ЛД<sub>50</sub> (Mc Namara et al., 1946; Wilhelmi, Domenjoz, 1951). Люис и др. (Lewis et al., 1955) исследовали влияние наркотических (барбитураты) и противосудорожных (дифенин, триметин) веществ на интоксикацию мышей ТЭПФ и не обнаружили выраженного антидотного эффекта ни у одного из исследованных веществ. В комбинации с атропином эти вещества также были неэффективны. Однако ослабление судорог под влиянием триметина установлено клинически и рекомендуется некоторыми авторами для практического использования (Dalleymagne, 1954).

Известно также, что ФОС значительно повышают чувствительность организма к некоторым лекарствам. Так, Джонс и др. (Johns, 1951) наблюдали у кроликов после введения ДФФ резкое увеличение чувствительности центральной нервной системы к теofilлину. Авторы не рекомендуют применять теofilлин для лечения бронхоспазма при отравлении ДФФ из-за опасности усиления судорог. К этому следует добавить, что ДФФ повышает чувствительность организма к морфину и питуитрину.

Из сказанного вытекает, что при разработке способов симптоматической терапии интоксикаций ФОС следует учитывать возможность повышения чувствительности организма к некоторым лекарственным препаратам.

#### КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ ОТРАВЛЕНИЙ ЛЮДЕЙ ФОС

Первые сведения об отравлениях эзеринотом стали известны в Европе около 1846 г. из описаний шотландских миссионеров. Эти описания, а также позднейшие наблюдения касаются своеобразного применения бобов растения, содержащего алкалоид эзерин, жителями Калабара (Нигерия). В Калабаре эти бобы в то время служили средством испытания людей, обвиненных в колдовстве. Кроме того, там были в моде дуэли, при которых противники делили между собой равное количество бобов (Е. А. Пеликан, 1878). Любопытно использование бобов с целью вершения суда (отсюда принятое одно время название — «судилищные бобы»). Обвиняемому в колдовстве публично предла-



гали съесть определенное количество бобов. Если у него возникала рвота, то его оправдывали; если же он умирал, то его осуждение считалось справедливым. Этот сколь наивный, столь и жестокий способ судопроизводства, тем не менее, содержал элементы психологического порядка. Дело в том, что человек, считавший себя невиновным, съедал бобы уверенно и быстро, в результате чего возникала рвота. Виновный ел бобы осторожно и медленно; это чаще всего приводило к тому, что у него не было рвоты, эзерин всасывался и наступала смерть (Gaddum, 1953). По свидетельству Фразера (Fraser, 1862), около 120 жителей Нигерии ежегодно погибали таким необычным путем.

Согласно первым сообщениям о действии калабарских бобов, симптомы отравления эзеринном состоят в постепенно нарастающем параличе произвольной мускулатуры. «Отравленный смотрит тупо, мышцы перестают ему повиноваться, он шатается на ногах, как пьяный. Дыхание становится трудным, пульс слабым и редким, тело охлаждается и покрывается потом; наконец, наступает полное расслабление и смерть — по-видимому, без страданий. Если обнаруживается понос и рвота, то жизнь в большинстве случаев спасена». Это описание, приведенное в первом научном руководстве по токсикологии на русском языке (Е. А. Пеликан, 1878), довольно красочно характеризует отравление эзеринном. Н. П. Кравков (1909) в ядовитом действии эзерина также подчеркивает его парализующий характер.

Отравление эзеринном в настоящее время встречается чрезвычайно редко и представляет больше исторический интерес. Это же относится и к другим антихолинэстеразным веществам, применяемым исключительно в медицинской практике и к тому же, как правило, врачебным персоналом. Наибольший токсикологический интерес представляют фосфорорганические соединения — в частности, инсектициды, на клинике отравлений которыми следует остановиться подробно.

## КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ИНТОКСИКАЦИИ ФОС

### Острое отравление

В монографии, посвященной фармакологии и токсикологии ФОС (С. Н. Голиков и В. И. Розенгарт, 1960), мы писали, что отравления этими ядами в медицинской практике встречаются довольно редко. Однако в настоящее время этого сказать уже нельзя. ФОС получили столь широкое распространение в различных областях производства и прежде всего в сельском хозяйстве, что отравления ими уже не являются редкостью, особенно в капиталистических странах, где не уделяется должного внимания вопросам профилактики.



Л. И. Медведь (1962) приводит данные Уэдда, согласно которым только за последние 4—5 лет в Японии зарегистрировано свыше 7000 случаев отравлений тиофосом, причем около трети пострадавших умерли.

Значительное число случаев отравлений ФОС зарегистрировано в Англии (Gordon, Frey, 1955).

А. Якубов (1962) описал 40 случаев отравления ФОС, имевших место в Таджикистане в 1959—1960 гг. А. В. Голубева и Э. Р. Гуглин (1962) наблюдали 17 человек, перенесших острое отравление меркаптофосом.

Отравления людей ФОС могут иметь место в случаях, когда персоналом, работающим с инсектицидами в производственных или лабораторных условиях, допускаются нарушения правил техники безопасности. В производственных условиях интоксикация ФОС может возникнуть в результате вдыхания паров, попадания ФОС на кожу или одежду и заглатывания их с водой и пищей. Смертельные дозы ФОС для человека по понятным причинам не установлены. В американской литературе приводятся, однако, данные, полученные путем специальных клинических исследований на людях (табл. 42).

Таблица 42

Токсичность ФОС для человека и их антихолинэстеразная активность  
(Grob, Harvey, 1958)

ФОС	Относительная антихолинэстеразная активность	Доза (мг/кг), вызывающая угнетение холинэстеразы на 50 %		Доза (мг/кг), вызывающая умеренные симптомы отравления		Рассчитанная смертельная доза (мг/кг)	
		в/м * или в/а **	per os	в/м или в/а	per os	в/м	per os
ДФФ . . . . .	1	0,07 (в/м)	0,28	0,083 (в/а)	0,32	0,48	2,1
ТЭПФ . . . . .	10	0,025 (в/м)	0,1	0,083 (в/м)	0,35	0,38	1,7
Зарин . . . . .	100	0,003 (в/а)	0,01	0,006 (в/а)	0,028	0,03	0,14

\* в/м — внутримышечное введение.

\*\* в/а — внутриартериальное введение.

Вопросы, связанные с оценкой токсического действия ФОС на человека в производственных условиях, меры предосторожности при работе с ними и правила, контролирующие их применение, изложены в официальном отчете комитета экспертов по инсектицидам Всемирной организации здравоохранения (1962).

Для характеристики клинической картины отравления ФОС



приводим случай отравления меркаптофосом (И. С. Файерман и др., 1962).

Мужчина, 31 г., через 1 ч 20 мин после работы в спецодежде (чистил цистерну из-под меркаптофоса) почувствовал резкую общую слабость, головокружение. Наблюдалась повторная рвота, а затем потеря сознания. В бессознательном состоянии доставлен в больницу.

От кожи больного, изо рта — резкий запах меркаптофоса. Кожные покровы покрыты каплями холодного пота. Обильное слюнотечение, повторная рвота. Сознание затемнено, только временами больной отвечает на повторные окрики. Зрачки резко сужены, реакция на свет отсутствует. Арефлексия, резко выраженная гипотония мышц конечностей. Непроизвольное мочеиспускание и дефекация. Дыхание учащено (до 50 в 1 мин), в легких — обильное количество сухих хрипов. Пульс 72 удара в минуту, аритмичный. Артериальное давление 118/70 мм рт. ст.

Вскоре (в течение последующих нескольких часов) появились судорожные подергивания мышц всего туловища и лица, симптом Бабинского с обеих сторон. В легких нарастало количество сухих хрипов, появилось обильное количество влажных хрипов (нарастающие явления отека легких), число дыханий достигло 60 в минуту, пульс участился до 130 ударов в минуту, артериальное давление несколько повысилось.

В дальнейшем состояние больного колебалось, периоды некоторого прояснения сознания, ослабления судорожных проявлений, уменьшения потоотделения и слюнотечения сменялись нарастающим оглушением (иногда бессознательным состоянием) с резким двигательным беспокойством, усилением фибриллярных подергиваний, отсутствием сухожильных и периостальных рефлексов, неподвижностью резко суженных зрачков, обильным потоотделением и пр.

Только через 36 ч после появления первых признаков отравления состояние больного начало прогрессивно улучшаться.

Приведенная картина отравления типична для интоксикации ФОС. Однако она может отличаться при отравлении разными веществами. Особенности в действии каждого конкретного соединения могут зависеть от преобладания центральных или периферических токсических эффектов, времени их наступления и продолжительности, не говоря уже о токсичности, которая сильно колеблется у различных представителей и наиболее высока в группе ФОС, получивших название нервных газов. Особенности отравления различными ФОС у человека описаны в литературе: дляДФФ данные приведены у Б. Кильби и М. Кильби (Kilby B. a. Kilby M., 1947) и Гроба (Grob et al., 1947); для ТЭПФ — у Фримана и Эпштейна (Freeman, Epstein, 1955) и Гроба и Харви (Grob a. Harvey, 1949); для паратиона — у Прибилла (Pribilla, 1955), Харрестона (Harrestan, 1957), Намба и Хираки (Namba, Hiraki, 1958) и Янтцена (Jantzen, 1951); для октаметила — у Гроба (1956); для систокса — у Петти (Petti, 1958).

Для отравления ТЭПФ и тиофосом характерно быстрое течение. Наряду с симптомами возбуждения парасимпатического отдела нервной системы постоянно отмечаются сильные расстройства функции центральной нервной системы. Судороги, так



же как и при отравлении нервными газами, являются постоянным признаком тяжелого отравления.

Симптомы резорбтивного действия наблюдаются при всех видах аппликации ФОС. Частота и быстрота их появления зависят от путей поступления яда в организм; особенно быстро они появляются при ингаляционном отравлении. В случае попадания яда в желудок, а также при его поступлении через кожу картина отравления развивается не столь бурно и симптомы резорбтивного действия возникают не сразу. Вначале они характеризуются нервно-психическими расстройствами (спутанность мыслей, затрудненная речь, дезориентация и др.), однако тут же к ним присоединяется нарастающее затруднение дыхания. Характерно шумное дыхание вследствие обилия секрета по всему ходу дыхательного тракта, а при аускультации — наличие широко распространенных хрипов. Смерть наступает в первые сутки при явлениях остановки дыхания, причем сердце продолжает некоторое время сокращаться и после остановки дыхания.

Особенности интоксикации при различных путях поступления ФОС определяются не только быстротой наступления симптомов резорбтивного действия, но и преобладанием тех или иных местных симптомов (табл. 43).

Таблица 43

Симптомы тяжелого отравления человека ФОС (в порядке появления) в зависимости от путей поступления яда в организм

Вдыхание паров ФОС	Поступление в желудок	Поступление через кожу
Тяжесть в груди. Головокружение. Нарушения координации движений. Максимальное сужение зрачков и нарушения зрения. Обильная саливация и ринорея. Потение. Потеря сознания. Общие мышечные подергивания. Судороги. Гипертония. Дыхательные расстройства. Вялый паралич. Цианоз. Гипотония. Коллапс. Смерть.	Тошнота, головокружение, рвота, понос. Общая слабость. Потение. Умеренный миоз и нарушение зрения. Мышечные подергивания. Нарушение координации. Спутанность мыслей и затруднение речи. Расстройства дыхания. Саливация и ринорея. Ступор. Затруднение дыхания (затрудненный выдох). Цианоз. Судороги. Кома. Недостаточность дыхания. Гипотония. Смерть.	Мышечные фибрилляции и потение на месте попадания яда. Общая слабость. Головокружение. Умеренный миоз. Обильная саливация и ринорея. Гипертония. Затруднение дыхания (выдох). Нарушения координации движений. Судороги. Ступор. Цианоз. Гипотония. Кома. Недостаточность дыхания. Смерть.

Так, попадание ФОС в желудок вызывает тошноту, рвоту, кишечные спазмы, тенезмы и другие расстройства функции желудочно-кишечного тракта (в более поздних стадиях эти же



явления могут возникнуть вследствие резорбтивного действия. Контакт ФОС с кожей вызывает потение и местные фибрилляции мышц. При длительном воздействии на кожу некоторые ФОС (карбофос, меркаптофос) вызывают раздражение и дерматиты (Е. И. Спыну, 1962), а при попадании в глаза — конъюнктивиты (И. Т. Ярешко, 1962; И. С. Фаерман, 1962), однако для большинства ФОС местное раздражающее действие нехарактерно. Местное воздействие паров приводит к расстройствам зрения (сужение зрачка, понижение аккомодации, ослабление зрения), усилению секреции слизистой носа, иногда кашлю. Эти симптомы в большинстве случаев не определяют тяжести отравления и его исхода, которые связаны с резорбтивным действием яда.

И. С. Фаерман и др. (1962) на основании опыта изучения клиники отравления меркаптофосом отмечают, что наряду с уже известной клинической картиной интоксикации (диспептические расстройства, миоз, нервно-психические нарушения, бронхоспазм и др.) наблюдаются и другие особенности — в частности, волнообразный характер течения патологического процесса: чередование тяжелого состояния с улучшениями. Так, в случае тяжелой острой интоксикации периоды затемненного сознания или бессознательного состояния сменялись периодами ясного сознания. Такой же волнообразный характер носили и другие проявления отравления: периоды ухудшения состояния, сопровождавшиеся усилением судорог, появлением непроизвольного

Таблица 44

Симптомы перорального отравления человека заринном

Доза	Симптомы
0,025 ЛД <sub>50</sub> 0,16 ЛД <sub>50</sub>	Бессимптомно Легкие симптомы возбуждения парасимпатического отдела нервной системы: тошнота, легкий спазм кишечника, обильное потение у половин испытуемых. Центральные эффекты. Сонливость у части субъектов.
0,33 ЛД <sub>50</sub>	Более отчетливые парасимпатические симптомы у всех субъектов: тошнота, спазмы кишечника, потение, сжатие за грудиной и под ложечкой. Брадикардия. Одышка. Частое мочеиспускание. Усталость. Иногда — мышечные подергивания. Центральные симптомы: головокружение, напряженность, тревога, сонливость с кошмарами, иногда — депрессия, эмоциональная лабильность. Тремор.
0,39 ЛД <sub>50</sub>	Те же симптомы, но более выражены. Кроме того — рвота, тенезмы, понос, фасцикуляции, бледность. Затрудненный и замедленный выдох



мочеиспускания, дефекации и другими симптомами, сменялись периодами ремиссий. Особенно ярко эта периодичность обнаруживалась в появлении потоотделения.

Клиническая картина при отравлении ФОС определяется симптомами резорбтивного действия ядов, которые могут быть разделены на периферические (мускарино- и никотиноподобные) и центральные (см. стр. 158).

По тяжести отравления ФОС могут быть разделены на легкие отравления, отравления средней тяжести и тяжелые.

Клиника легких отравлений ФОС и отравлений средней тяжести подробно изучена Гробом и Харви (1958). Соответствующие данные из их работы приведены в табл. 44.

### Хроническая интоксикация

Симптомы хронической интоксикации ФОС изучены не так подробно, как клиника острого отравления. Между тем, их выявление чрезвычайно важно для своевременного диагностирования интоксикации у лиц, длительно соприкасающихся в работе с ФОС. Заслуга изучения хронической интоксикации принадлежит советским авторам.

В. А. Крючков (1957) приводит данные по динамическому наблюдению в течение 2 лет за состоянием здоровья работников, занятых в производстве меркаптофоса. Некоторые из них жаловались на головную боль, головокружение, ощущение тяжести в голове, чувство сжатия в висках, понижение памяти, нарушение сна, понижение аппетита. У лиц с более выраженными явлениями интоксикации наблюдалась дезориентация и нарушение сознания. В ранних стадиях интоксикации отмечались сосудистые расстройства. Иногда у обследованных имелось нарушение глазо-сердечного рефлекса Ашнера, снижение памяти, угнетение эмоциональной сферы. У других отмечалась ограниченная микросимптоматика, выражающаяся в понижении корнеальных рефлексов, иногда появлении нистагма, сглаженности носогубной складки, отклонении языка и треморе пальцев.

М. Е. Мачабели, М. И. Таренко, Г. М. Гамбашидзе (1957) пишут, что лица, имеющие контакт с октаметилом и, особенно, меркаптофосом, предъявляют жалобы на жжение в глазах, головную боль, потерю аппетита и тошноту. При обследовании этих рабочих была обнаружена артериальная гипотония, брадикардия и, в некоторых случаях, дерматит.

В. Н. Трефилов, И. С. Фаерман и др. (1962) установили, что при хронической интоксикации меркаптофосом наиболее рано проявляются изменения в виде нарушений вегетативно-сосудистой регуляции (синусовая аритмия, брадикардия, лабильность пульса, асимметрия кровяного давления, акроцианоз) и астении (повышенная утомляемость, быстрая истощаемость психических

процессов).  
с меркаптофосом.  
В этот период  
холинэстеразы  
парасимпатиче-  
ских лиц, контак-  
тирующих с ФОС  
Т. А. Асрибидзе  
(1962), и др.

К частым симптомам  
относятся та-  
тошноту.

Гроб и Харви  
действия и  
проведены  
ние 2—5 дней.  
Наиболее  
ции вы-  
но-кишечного  
стройства  
лярные по-  
лись срав-  
миоз, затр

Из ска-  
ции ФОС  
диспансер  
ходимо пр

Диагно-  
ских, мор

Клиниче-

Миоз и  
ции (при  
ров). Мы-  
ляции и п  
попадания  
Обилие с  
дыхатель-  
труднения  
численные  
функции  
ной сист  
нические  
шения фу  
кишечной



процессов). Кроме того, у части лиц, длительно работавших с меркаптофосом, наблюдались гастриты, увеличение печени. В этот период у части обследуемых была снижена активность холинэстеразы. Ранние нарушения функции преимущественно парасимпатического отдела нервной системы при обследовании лиц, контактирующих с меркаптофосом, отмечают также Т. А. Асрибекова (1962), Х. З. Любецкий, Б. Э. Гуревич и др. (1962), и др.

К частым симптомам хронической интоксикации ФОС относятся также жалобы на головную боль, головокружение, тошноту.

Гроб и др. (1950) подробно описали клинические проявления действия небольших доз ДФФ на людей. Наблюдения были проведены на 50 здоровых людях, которым ежедневно в течение 2—5 дней внутримышечно вводился ДФФ в дозе 1,5—3,0 мг. Наиболее постоянные симптомы отражали расстройства функции высших отделов центральной нервной системы и желудочно-кишечного тракта. С меньшим постоянством отмечались расстройства функции сердечно-сосудистой и мышечной (фибрилярные подергивания) систем. Некоторые симптомы встречались сравнительно редко (потение, лакримация, саливация, миоз, затруднение дыхания, брадикардия, тремор и др.).

Из сказанного видно, что симптомы хронической интоксикации ФОС более полиморфны и менее специфичны. Поэтому при диспансеризации лиц, занятых работой с инсектицидами, необходимо проводить тщательное комплексное исследование.

Диагностика отравлений ФОС основана на ряде клинических, морфологических и биохимических признаков (табл. 45).

Таблица 45

#### Диагностические признаки отравления ФОС

Клинические признаки	Патоморфологические признаки	Биохимические признаки
Миоз и спазм аккомодации (при воздействии паров). Мышечные фибрилляции и потение (на месте попадания ФОС на кожу). Обилие секрета в верхних дыхательных путях. Затруднения дыхания. Многочисленные расстройства функции центральной нервной системы. Клонико-тонические судороги. Нарушения функции желудочно-кишечного тракта.	Быстрое наступление трупного окоченения. Синюшность. Вытекание жидкости изо рта и носа. Миоз. Гиперемия и отечность внутренних органов. Четкообразный кишечник. Эмфизема и небольшой отек легких.	Угнетение активности холинэстеразы сыворотки крови и эритроцитов, а также органов (посмертно).



## ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ ФОС

Лечение отравлений антихолинэстеразными веществами основано на следующих основных принципах: 1) прекращение дальнейшего поступления яда в организм; 2) антидотная терапия; 3) искусственное дыхание; 4) симптоматическая терапия.

### Прекращение дальнейшего поступления яда в организм

Прекращение дальнейшего поступления яда в организм достигается различными способами, в зависимости от условий. В случае пребывания пострадавшего в атмосфере паров ФОС на него надевают противогаз и выводят (выносят) из отравленной атмосферы. При попадании на одежду или открытую кожу жидкого вещества его дегазируют 10—15%-ным раствором аммиака, загрязненную одежду снимают, кожу промывают; в случае попадания вещества в глаза необходимо немедленно сделать промывание. Отравление может также произойти от вдыхания инсектицидного порошка, содержащего ФОС. В таких случаях необходимо вынести пострадавшего из загрязненного помещения и удалить яд со слизистых оболочек и кожи.

При попадании яда в желудок необходимо срочно дать пострадавшему взвесь карболена в 2%-ном растворе соды. Таким способом достигается не только связывание яда, но и его разрушение щелочью. Эффективность этого способа проверена экспериментально (Е. И. Спыну, 1959).

Все указанные процедуры не должны занимать много времени, так как явления интоксикации нарастают очень быстро.

### Антидотная терапия

Антидотная терапия состоит в назначении атропина или другого эффективного холинолитика (атропинизации) и применении реактиваторов холинэстеразы.

### Атропинизация

Опыт применения атропина для лечения отравлений ФОС у людей показал, что в случае тяжелых отравлений эффективными являются лишь большие дозы антидота. Своевременное применение атропина в достаточной дозе в значительной мере подавляет судороги и другие центральные эффекты действия ФОС, уменьшает явления бронхоспазма и прочие симптомы возбуждения парасимпатического отдела нервной системы. Этот эффект обычно бывает недостаточно стойким, в связи с чем инъекции атропина приходится повторять по несколько раз



в течение часа. Ввиду относительной устойчивости пострадавших к атропину, его суточная доза, по данным Фримана и Эпштейна (Freeman, Epstein, 1955), в отдельных случаях может достигать 24 мг.

Для иллюстрации сказанного приводим случай, описанный Флешем (Flesch, 1958). Человек с целью самоубийства принял 2—3-кратную смертельную дозу метилпаратиона. Вскоре у него появились следующие симптомы отравления: профузное потоотделение, миоз, бессознательное состояние, в дальнейшем развился отек легких. Пострадавшему было сделано промывание желудка и начато внутривенное введение атропина (первая доза — 2 мг плюс капельное введение 4 мг, в последующем — введение по 0,5 мг внутривенно через каждые  $\frac{1}{2}$  ч). За первые 3 ч в общей сложности было введено 10,5 мг атропина. После того как доза атропина составила 8 мг, у пострадавшего расширились зрачки, прекратилось потоотделение, исчез отек легких и прекратилась секреция слизи в бронхах. Через 4 ч после начала лечения у больного полностью восстановилось сознание. На основании опыта лечения интоксикации паратионом автор рекомендует (при пероральном поступлении яда) обильные промывания желудка взвесью активированного угля и внутривенное (а также внутримышечное) введение атропина (до 70—100 мг в сутки!).

Атропин, по-видимому, достаточно эффективен и при отравлении детей. Так, Туффил (Tuthill, 1958) сообщил об излечении двухлетнего ребенка от тяжелого отравления эмульсией паратиона. Ребенку вначале было введено 0,8 мг атропина подкожно, но, ввиду отсутствия четкого эффекта, атропин ввели внутривенно дважды по 0,4 мг. Дальнейшее лечение состояло в повторных введениях этой же дозы подкожно. Общая доза атропина была 2,8 мг.

Для лечения различных форм отравления ФОС может быть рекомендована следующая схема атропинизации.

При легких отравлениях вводят 2 мг атропина (внутримышечно или подкожно), затем повторяют его введение через каждые 20 мин до появления признаков атропинизации (сухость во рту). При отравлениях средней тяжести вводят 2—4 мг атропина и повторяют введение по 2 мг каждые 3—8 мин до прекращения симптомов отравления или появления признаков атропинизации. При тяжелых поражениях (судороги, расстройство дыхания) начальные дозы атропина составляют 4—6 мг (желательно внутривенное введение; другие способы введения могут оказаться неэффективными из-за всасывания атропина). Введение атропина повторяется через соответствующие интервалы таким образом, чтобы поддерживались умеренные при-



знаки атропинизации в течение 1—2 суток. Полной дозой атропина на курс лечения считают 50 мг (Grob, 1956). Когда симптомы отравления начинают стихать, можно перейти на дачу атропина *per os*. Судя по клиническим наблюдениям, при отравлении ФОС устойчивость человека к атропину значительно повышена, причем тем больше, чем тяжелее отравление; поэтому опасения в отношении возможного отравления атропином не должны преувеличиваться. Нужно, однако, помнить о противопоказаниях к применению атропина: атропин нельзя вводить пострадавшему при резкой кислородной недостаточности из-за возможности осложнений со стороны сердца (трепетание желудочков). В этом случае антидотному лечению должно предшествовать искусственное дыхание. Следует также помнить о нежелательности ошибочного введения повышенных доз атропина неотравленному человеку. В таких случаях могут наблюдаться явные признаки атропинизации (сухость кожи и слизистых оболочек, жажда, затруднения при глотании, мидриаз, парез аккомодации, падение физической и умственной работоспособности, головная боль, головокружение, потеря ориентировки, галлюцинации, дремота, иногда маниакальное состояние). Эти явления могут быть ослаблены эзерином, прозерином или галантамином. В условиях самопомощи и взаимопомощи доза атропина не должна превышать 2 мг; в случае оказания помощи младшим и средним медицинским персоналом максимальная доза атропина составляет 6 мг (Grob).

Атропин может быть заменен другими эффективными холинолитиками (см. стр. 303); однако данные об их клиническом использовании в литературе нет, если не считать единичных сообщений о применении для лечения отравления ФОС дипаркола — динезина (Fournier et al., 1961). Однако по этим работам нельзя судить о преимуществах дипаркола перед атропином.

Применение атропина для лечения отравлений ФОС проверено на практике и дало несомненные положительные результаты. Однако в литературе встречаются отдельные сообщения о недостаточной эффективности атропина при тяжелых поражениях ФОС, сопровождающихся развитием коматозного состояния. Так, Ратус и Боттомли (Ratus, Bottomly, 1958) сообщили об отравлении паратионом, причем больной погиб, несмотря на внутривенное введение атропина. Такого рода исходы особенно возможны, если атропин применен с запозданием и в недостаточной дозе.

К недостаткам атропина относится также неполнота его антагонизма с ФОС. Атропин устраняет мускариноподобные симптомы, в то время как очень опасное никотиноподобное действие на дыхательные мышцы продолжает оставаться. Такого рода явления особенно часто могут наблюдаться при отравлении

большими  
дозы. В та  
дать от пр

До пос  
ния реакт  
ментальн  
ния о воз  
ния людей  
vies, Gree  
der et al.,

Из м  
практике  
2PAS. Ус  
от содерж  
(Sundwal  
2PAS в д  
ческий ур  
после вв  
рез 20 м  
терапевт  
сразу до  
30 мин о  
и после в  
дения 45  
трация в  
жится п  
этих дан  
следует  
дение та  
случаях.  
эффекти  
отравле

В бо  
примене

Для  
линэстер  
1960) п  
после 4  
Убедив  
автор п  
ного вл  
парата,  
Еще

мана и



большими дозами ФОС, превышающими 1—2 смертельные дозы. В таких случаях хороший лечебный эффект можно ожидать от применения реактиваторов холинэстеразы.

### Применение реактиваторов холинэстеразы

До последнего времени в литературе в отношении применения реактиваторов холинэстеразы приводились лишь экспериментальные данные (см. стр. 312). Недавно появились сообщения о возможности их эффективного использования для лечения людей (Erdmann et al., 1958, 1960; Grob, Johs, 1958; Davies, Green, 1959; Funckes, 1960; Laveque et al., 1961; Michenfelder et al., 1961, и др.).

Из многих реактиваторов холинэстеразы в медицинской практике нашли применение пока два препарата: 2ПАМ и 2ПАС. Установлено, что их эффективность во многом зависит от содержания препарата в крови. По данным Сундвалля (Sundwall, 1960), при внутримышечном введении человеку 2ПАС в дозе 30 мг/кг (в 12,5%-ном водном растворе) терапевтический уровень в плазме (4  $\gamma$ /мл) достигается через 5—10 мин после введения, максимальная концентрация (15  $\gamma$ /мл) — через 20 мин; через 90 мин концентрация держится на уровне терапевтической. При внутривенном введении 20 мг/кг 2ПАС сразу достигается концентрация 40—50  $\gamma$ /мл, однако через 30 мин она снижается, а через час оказывается такой же, как и после внутримышечного введения. В случае перорального введения 45 мг/кг в желатиновых капсулах максимальная концентрация в плазме (5  $\gamma$ /мл) достигается только через 1 ч и держится примерно на этом уровне в течение 3 ч. На основании этих данных предпочтительным, особенно в тяжелых случаях, следует считать внутривенное введение. Внутримышечное введение также может быть рекомендовано, но не в экстренных случаях. Пероральное введение при острых отравлениях малоэффективно, но может оказаться полезным для профилактики отравления и при легкой интоксикации.

В большинстве описанных случаев отравления ФОС был применен внутривенный способ введения реактиватора.

Для характеристики лечебного эффекта реактиваторов холинэстеразы рассмотрим несколько случаев. Функес (Funckes, 1960) применил 2ПАМ для лечения мужчины, доставленного после 4-часового контакта с паратионом в состоянии коллапса. Убедившись в безрезультатности повторных инъекций атропина, автор применял 2ПАМ. Через 10 мин после начала внутривенного вливания 2ПАМ, когда введено было примерно 30 мг препарата, наступило резкое улучшение состояния пострадавшего.

Еще более разительный пример можно встретить у Эрдамана и др. (Erdmann et al., 1958). Мужчина выпил раствор,



содержащий 6 г паратиона, что соответствует его 10—20-кратной смертельной дозе. Спустя 15 мин у пострадавшего появилась рвота, он впал в бессознательное состояние, наступили расстройства дыхания, возникли клонические судороги. На протяжении 15 мин отравленному внутривенно было введено 14 мг атропина. Это привело лишь к временному улучшению: больной вскоре снова впал в коматозное состояние. Решающее влияние на состояние пострадавшего оказало введение 2ПАМ (внутривенно 50 мл 1%-ного раствора): сразу же после введения антидота у больного улучшилось дыхание, и он пришел в сознание.

Оба приведенных случая чрезвычайно показательны в том отношении, что они свидетельствуют о явно недостаточной эффективности атропина при тяжелых формах отравления ФОС и перспективности применения в таких случаях реактиваторов холинэстеразы.

Заслуживает также упоминания случай, приведенный Форнье и др. (Fournier et al., 1961b). Юноша 17 лет с целью самоубийства принял 0,8 г паратиона; через 3 ч он впал в коматозное состояние, сопровождавшееся цианозом, брадикардией, миоприазом, нарушениями дыхания и судорогами. Несмотря на энергичное и обоснованное лечение (атропин, дипаркол, камфора, кордиамин, промывание желудка, интубация с искусственным дыханием и трахеотомия), состояние больного оставалось тяжелым. Медленное (в течение часа) внутривенное введение 2ПАС дважды по 500 мг оказало выраженное лечебное действие (прекращение комы и судорог, восстановление пульса и нормализация дыхания). Больной был выписан в хорошем состоянии.

Вряд ли следует, однако, ограничивать применение 2ПАМ только тяжелыми формами отравления ФОС. Этот антидот оказывается достаточно эффективным и при более легких отравлениях, причем в этих случаях он может приниматься внутрь. Эрдман и др. (Erdmann и др., 1960) приводят такой случай. Три человека случайно отравились ДФФ. Через 30 мин после контакта у них развился сильный миоз (сохранявшийся до 10 дней), появились боли в животе, слабость в ногах, саливация, сопровождающаяся болями в области слюнных желез, ринорея. Активность холинэстеразы крови понизилась на 50%. Через 6 ч после однократного приема 500 мг 2ПАМ почти все симптомы отравления исчезли. Вскоре после приема антидота наблюдалась реактивация холинэстеразы, но полное восстановление активности наступило только через 10 дней.

Резкое повышение активности холинэстеразы, до 60% нормы, после введения 2ПАС человеку, отравленному фосфорорганическим инсектицидом, отмечает также Левек и др. (Leveque et al., 1961). На протяжении последующих суток наблюдалось

более медлен  
отравления  
ПАС или  
Эффект  
ниях людей  
антагонист  
на различ  
Johns, 1958  
2ПАМ или  
званный са  
этом муска  
не устраня  
Провер  
2ПАМ сос  
500 мг/мин  
принять и

Искусс  
лого отрав  
ния с явл  
ству иску  
димости  
слюной и  
Удали  
ходимости  
(Elam et  
личных с  
дей нерв  
авторов  
кусствен  
дыхатель  
сутствия  
вдувание  
пострада  
вдувание  
рез трах  
отравлен  
быть за  
применя  
Симп  
ний. В  
дотов, р  
по 1,0,  
барбита



более медленное повышение активности холинэстеразы. По наблюдениям Целисье и др. (Celice et al., 1960), после восстановления нормальной активности холинэстеразы повторные приемы ПАМ неэффективны.

Эффективность реактиваторов холинэстеразы при отравлениях людей ФОС находит свое подтверждение и в наличии антагонистических отношений между 2ПАМ и ФОС в действии на различные функции. Так, по данным Гроба и Джонса (Grob, Johns, 1958), у людей введение внутривенно 0,05—0,1 мг 2ПАМ или ДАМ быстро устраняло нервно-мышечный блок, вызванный самыми различными ингибиторами холинэстеразы, при этом мускариноподобные симптомы и нарушения функции ЦНС не устранялись.

Проверенная в клинических условиях полная лечебная доза 2ПАМ составляет 2 г. Рекомендуемая скорость введения — 500 мг/мин (Grob, Johns, 1958). Такую же дозировку можно принять и для 2ПАС.

### Искусственное дыхание

Искусственное дыхание производится обычно в случае тяжелого отравления ФОС, когда имеются резкие затруднения дыхания с явлениями цианоза. Прежде чем приступить к производству искусственного дыхания, необходимо убедиться в проходности воздухоносных путей, которые часто бывают забиты слюной и слизью.

Удалив слизь из дыхательных путей и убедившись в их проходности, приступают к искусственному дыханию. Илем и др. (Elam et al., 1951), специально проверявшие пригодность различных способов искусственного дыхания при отравлении людей нервным газом, в соответствии с мнением многих других авторов пришли к выводу о непригодности ручных способов искусственного дыхания из-за наличия бронхоспазма и паралича дыхательных мышц. Авторы в полевых условиях, в случае отсутствия соответствующих аппаратов, рекомендуют применять вдывание воздуха непосредственно изо рта оператора в маску пострадавшего. Значительно лучшие результаты получаются при вдывании воздуха (лучше в смеси с кислородом) в легкие через трахею, для чего служат специальные аппараты. В случаях отравлений средней тяжести искусственное дыхание может быть заменено кислородотерапией. И то, и другое необходимо применять до восстановления дыхательной функции.

Симптоматическая терапия производится по ряду показаний. В случае продолжения судорог, несмотря на дачу антидотов, рекомендуется введение триметина (повторные инъекции по 1,0, но не более 5,0 в сутки), тиопентала натрия или пентобарбитала натрия (введение последнего предпочтительнее из-



за меньшего угнетающего влияния на дыхательный центр). Барбитураты также назначаются для снижения беспокойства и страха. Ввиду имеющихся расстройств дыхания наркотики рекомендуются применять с осторожностью: внутримышечно и в половинной дозе. Препараты морфия противопоказаны. При наличии резких расстройств дыхания показано введение коразола. Хороший результат дает кислородная терапия. На введение кислорода лучше переходить сразу после прекращения искусственного дыхания, как только восстановились самостоятельные дыхательные движения, но явления гипоксии еще не прошли. Для стимулирования сердечной деятельности и борьбы с гипотонией и цианозом некоторые авторы рекомендуют применять норадреналин, симпатол и кордиамин (Hyndrickx, Ver-cuysse, 1961).

При тяжелых формах отравления хороший результат дает применение кортизона, направленное на стимулирование неспецифических защитных реакций организма. В отдельных случаях может понадобиться, по-видимому, применение средств защиты печени. В период выздоровления показана также витаминотерапия. Во избежание наступления аспирационной бронхопневмонии рекомендуется раннее применение антибиотиков.

Ады  
Ако  
Али  
Алу  
Ани  
с  
Ани  
Ани  
Р  
Ани  
Ано  
Ано  
Арб  
Арб  
Арт  
Асе  
Аср  
Аф  
Аф  
Ба  
Ба  
Ба  
Ба  
Бе  
Бе  
Бе  
Бе  
Бл  
Бс



## ЛИТЕРАТУРА

- Адыширин-Заде Р. Ф. Вестн. офтальмол., 1960, 3, 38.
- Акопян Н. Е. и Самвелян В. М. Фармакол. и токсикол., 1958, 5, 38.
- Алиев А. А. Физиол. журн. СССР, 1958, 1, 57.
- Алуф М. А. Фармакол. и токсикол., 1955, 2, 21.
- Аничков С. В. В сб.: Ганглиолитики и блокаторы нервно-мышечных синапсов. ИЭМ АМН СССР, Л., 1958, 4.
- Аничков С. В. и Беленький М. Л. Учебник фармакологии Л., 1956.
- Аничков С. В. и Беленький М. Л. Фармакология химиорецепторов каротидного клубочка. Л., 1962, 110.
- Анненкова Г. Ф. Тр. Курского мед. ин-та, 1955, 2, 10, 178.
- Аносов Н. Н. (1945—1955). Цит. по Н. Н. Аносову и М. А. Розину, 1956.
- Аносов Н. Н., Розин М. А. Прозерин, эзерин, дибазол и их применение в невропатологии. Л., 1956.
- Арбузов А. Е. и Арбузов Б. А. Журн. общей химии, 1932, 2, 345.
- Арбузов Б. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений, М., 1957, 9.
- Артемьев Д. И. Тр. Туркменск. науч.-исслед. трахоматозн. ин-та, 1960, 6, 93.
- Асекритова В. Н. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 472.
- Асрибекова Т. А. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 59—64.
- Афонская Л. С. и Зайкольников И. В. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 437.
- Афонская Л. С. и др. Фармакол. и токсикол., 1963, 2, 184.
- Балашова Е. К. и др. Биохимия, 1958, 23, 5, 674.
- Балашова Е. К. и др. В кн.: Фосфорилирование и функция. ИЭМ, Л., 1960, 275.
- Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию. М., 1959.
- Барышников И. И. и Соколовский В. В. Тез. докл. Всесоюз. совещ. фармакологов. Рига, 1957.
- Белоус А. А. Фармакол. и токсикол., 1950, 1, 23.
- Белошапко П. А. и Фой А. М. Обезболивание и ускорение родов. М., 1954.
- Беляева Б. А. и Чайковская А. Л. Казанск. мед. журн., 1962, 1, 58.
- Беритов И. С. и Бакуридзе А. Н. Физиол. журн. СССР, 1940, 28, 1, 3.
- Берн Г. Функции химических передатчиков. М., 1961.
- Блажко И. И. и Григораши С. Н. Здравоохранение Советской Латвии, 1951, VI, 98—103.
- Боголепов Н. К. Нарушения двигательных функций при сосудистых поражениях головного мозга. М., 1953, 378.
- Богоров И. И. В кн.: Обезболивание в родах. Изд. АМН СССР, 1952, 116.
- Богоявленская Н. Л. В кн.: Фармакология новых лекарств. М., 1953.
- Борисов П. И. и Розенгарт В. И. Вопр. мед. химии, 1950, 2, 53.



- Бочарова Л. П. и Украинцев Н. С. Биохимия, 1958, 3, 388.
- Брахнова И. Т. В кн.: Всесоюз. конф. по гигиене и токсикологии инсекто-фунгицидов. Киев, 1957а, 22.
- Брахнова И. Т. Фармакол. и токсикол., 1957б, 3, 78.
- Бресткин А. П. и др. Биохимия, 1963, 4, 653.
- Бресткина Л. М. Материалы X Всесоюз. конф. фармакологов. Волгоград, 1962, 59.
- Брик И. Л. и Яковлев В. А. Биохимия, 1962а, 27, 3, 481.
- Брик И. Л. и Яковлев В. А. Биохимия, 1962б, 27, 6, 993.
- Бурый В. С. В кн.: Всесоюз. конф. по гигиене и токсикологии инсекто-фунгицидов. Киев, 1957, 29.
- Бутомо В. Г. В кн.: Обезболивание в родах. АМН СССР, 1952, 105.
- Бялко Н. К. В кн.: Всесоюз. конф. по гигиене и токсикологии инсекто-фунгицидов. Киев, 1957, 31.
- Вальдман А. В. Фармакол. и токсикол., 1950, 6, 6.
- Вальдман А. В. Фармакол. и токсикол., 1952, 1, 14.
- Варга Е. Журн. общ. биол., 1959, 20, 1, 3.
- Варшавская Ф. Э. Клиническое испытание действия наиболее доступных в широкой практике методов и средств обезболивания родов. Автореф. дисс. Л., 1954.
- Веденеева З. И. Фармакол. и токсикол., 1951, 2, 28.
- Вейс Р. В. и Карасик В. М. Физиол. журн. СССР, 1947, 2, 299.
- Весенин А. П. Тр. Ивановск. мед. ин-та, 1957, 13, 340.
- Весенин А. П. Тр. Ивановск. мед. ин-та, 1958, 19, 124.
- Волкова В. Д. и Хананшвили М. М. Материалы IX Всесоюз. фарма-логич. конф. Свердловск, 1961, 46.
- Волкова Р. И. и др. Вопросы мед. хим., 1961, 7, 3, 250.
- Волокитченко А. Е. Офтальм. журн., 1957, 7, 408.
- Воскресенская А. К. Функциональные свойства нервно-мышечного при-бора насекомых. Изд. АН СССР, 1956.
- Вяселов Р. А. Казанский мед. журн., 1961, 2, 43.
- Вяселова С. М. и др. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 524.
- Вятчанников К. А. В кн.: Материалы научн. сессии, посвящ. 40-летию БССР. Минск, 1958, 42.
- Вятчанников К. А. Сб. научн. работ Минского мед. ин-та, 1959, 23, 112.
- Вятчанников К. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 495.
- Гальперин С. И. и Кузьменко Г. Н. В кн.: 13-е совещ. по физиоло-гическим проблемам, посвящ. памяти И. П. Павлова. М., 1948, 30.
- Гар К. А., Сазонова Н. А. и Фадеев Ю. Н. Докл. АН СССР, 1955а, 103, 1, 173.
- Гар К. А., Сазонова Н. А. и Фадеев Ю. Н. Докл. АН СССР, 1955б, 102, 1, 85.
- Георгиу П. и др. Фармакол. и токсикол., 1959, 5, 421.
- Гинецинский А. Г. Физиол. журн. СССР, 1947, 4, 413.
- Гинецинский А. Г. и Михельсон Н. К. Успехи совр. биол., 1937, 6, 399.
- Глаголева И. М. и Либерман Е. А. Успехи совр. биол., 1963, 1, 68.
- Глик Д. Методика гисто- и цитохимии. М., 1950.
- Годовиков Н. Н. и др. Докл. АН СССР, 1963, 151, 5, 1104.
- Годовиков Н. Н., Зеймаль Э. В., Кабачник М. И. и Михель-сон М. Я. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравления. Медгиз, 1962, 203.
- Голиков С. Н. Фармакол. и токсикол., 1956, 2, 38.
- Голиков С. Н., Кузнецов С. Г. и Иоффе Д. В. Фармакол. и тоksi-кол., 1962, 6, 651.
- Голиков С. Н. и Локтионов С. И. Вестн. АМН СССР, 1963, 8 77—87.



- Голиков С. Н., Печенкин В. А. и Федорчук Ю. Г. Материалы 7-й Всесоюз. конф. фармакологов. Харьков. 1958. 33.
- Голиков С. Н. и Розенгарт В. И. Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений, Л., 1960.
- Голиков С. Н. и Федорчук Ю. Г. Пат. физиол. и exper. тер., 1959, 2.
- Голубева А. В. и Гуглин Э. Р. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 458—462.
- Гошев А. И. Вопросы мед. химии, 1958, 4, 2, 149.
- Гращенко Н. И. Огнестрельные ранения позвоночника и спинного мозга. Медгиз, 1946.
- Гращенко Н. И. Межнейронные аппараты связи — синапсы и их роль в физиологии и патологии. Минск, 1948.
- Денисенко П. П. Ганглиолитики. Л., 1959.
- Денисенко П. П. В кн.: Шок и терминальное состояние. Тр. науч. сессии, посвящ. памяти И. И. Джанелидзе. Л., 1960, 111.
- Денисенко П. П. Фармакол. и токсикол., 1962, 3, 269.
- Де Робертис Е., Новинский В. и Саэс Ф. Общая цитология, пер. с англ. М., 1962.
- Диденко А. Е. В кн.: Токсикология и фармакология ядохимикатов, применяемых в сельском хозяйстве. Минск, 1961, 28.
- Доклады Всемирной организации здравоохранения. Токсическое действие пестицидов на человека. 12 отчет комитета экспертов по инсектицидам. М., 1962.
- Донская Л. В. и Хаунина Р. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 1961, 52, 11, 69.
- Донская Л. В. и Хаунина Р. А. Фармакол. и токсикол., 1963, 1, 45.
- Дроздова З. А. Холинергические механизмы в родовом акте и метод родоускорения применением прозерина. Дисс. Л., 1951.
- Дроздова З. А. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957а, 196.
- Дроздова З. А. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных средств. Л., 1957б, 305.
- Другов Ю. В. (ред.). Санитарно-химическая защита. Медгиз, 1959.
- Дурмишьян М. Г. О механизмах эффектов афферентных раздражителей. Медгиз, 1955.
- Зайкононикова И. В. Фармакол. и токсикол., 1962, 3, 339.
- Зайкононикова И. В. и Студенцова И. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 500.
- Закусов В. В. Экспериментальные данные по фармакологии нервной системы. Л., 1948.
- Закусов В. В. Фармакология нервной системы. Л., 1953.
- Закусов В. В. Фармакология. М., 1960.
- Заугольников С. Д., Доклад на Второй конференции по химии и применению ФОС. Казань, 1959.
- Заугольников С. Д. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962.
- Захарова А. В. и Розенгарт В. И. Биохимия, 1949, 14, 67.
- Збуржинский В. К. Тр. Ленингр. сан.-гиг. мед. ин-та, 1959, 47, 238.
- Зеймаль Э. В. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 416.
- Зеймаль Э. В. Фармакол. и токсикол., 1963, 2, 157.
- Зеймаль Э. В. и др. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 424.
- Зеймаль Э. В. и др. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, М., 1962, 403.
- Зеленский К. П. В сб.: Материалы научной конференции по патологической физиологии сельскохозяйственных животных. М., 1962, 100.
- Зольников С. М. и Мистакопуло Н. Ф. Хирургия, 1960, 4, 44.
- Зубков А. А. Успехи совр. биол., 1940, 12, 2, 350.



- Зубкова С. Р. и Правдич-Неминская Т. В. Рефераты научно-исслед. работ за 1945 г. Отделение биол. наук, АН СССР, 1947.
- Изергина А. Ю. Рефераты научно-исслед. работ. Медико-биол. науки. М., 1949, 7, 121.
- Ильюченко Р. Ю. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 318.
- Ильюченко Р. Ю. В кн.: Фармакология новых седативных средств. М., 1962, 32.
- Ильюченко Р. Ю. и Островская Р. У. Фармакол. и токсикол., 1962, 6, 643.
- Кабанов А. Н. Докл. VII Всесоюз. съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 1947, 155.
- Кабачник М. И. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 18.
- Каган Ю. С. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 384.
- Каган Ю. С. Материалы VIII Всесоюз. конф. фармакологов. Тбилиси, 1960, 64.
- Каган Ю. С. Токсикология ряда фосфорорганических инсектицидов и гигиена труда при их применении. Автореф. дисс. Киев, 1961.
- Каган Ю. С. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 458.
- Каган Ю. С. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962а, 188.
- Каган Ю. С. и Иванова З. В. Фармакол. и токсикол., 1961, 2, 220.
- Каган Ю. С. и Иванова З. В. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 64—65.
- Каган Ю. С. и Маковская Е. И. Физиол. журн., АН УССР, 1957, 3, 3, 77.
- Кадыков Б. И. Всесоюз. конф. по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев 1957, 52.
- Казакевич М. А. Невропатол. и психиатр., 1954, 8, 633.
- Казakov Е. С. и др. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений, Медгиз, 1962, 241—247.
- Каплун Э. Г. Уч. зап. Московск. гос. педагогич. ин-та, 1953, 24, 2 51.
- Карасик В. М. Успехи совр. биол., 1946, 21, 1. 1.
- Карасик В. М. В кн.: Руководство по фармакологии, под ред. Н. В. Лазарева. Л., 1962, 436.
- Касида Дж. Е. и др. V Междунар. биохим. конгрес. Рефераты секционных сообщений. М., 1962, т. 2, 252.
- Кеворкян А. А. Сборн. науч. раб. Витебского гос. мед. ин-та Минск, 1952.
- Кибяков А. В. Казанск. мед. журн., 1933, 5—6, 457.
- Кибяков А. В. Успехи совр. биол., 1959, 47, 3, 265.
- Кириленко Д. В. Тр. 1-й биохим. конф. Прибалтийских республик и Белоруссии. Тарту, 1961, 150.
- Кириленко Д. В. и др. Сб. науч. студенч. работ Минского мед. ин-та, 1957, 2, 54.
- Кириллова А. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 1943, 16, 1, 53.
- Классификация и номенклатура ферментов. М., 1962.
- Коган А. Б. Физиол. журн. СССР, 1958, 9, 810.
- Коган А. Б. В кн.: Электроэнцефалографическое исследование высшей нервной деятельности. АН СССР, М., 1962, 42.
- Комиссаров И. В. Фармакол. и токсикол., 1957, 20, 29.
- Комиссаров И. В. Здравоохран. Белоруссии, 1961, 7, 41.
- Кононенко В. С. Журн. высш. нерв. деят., 1963, 2, 280.
- Корчагина Н. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 559.
- Коштойанц Х. С. Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция. М., 1951.



- Кравков Н. П. Основы фармакологии. СПб., 1909.
- Кравченко Н. А. и др. Докл. АН СССР, 1962, 144, 1, 118.
- Краснова В. М. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений АН СССР, 1962, 505.
- Краснова В. М. и Зайкольников И. В. Казанск. мед. журн., 1961, 2, 46.
- Крейндлер А. В кн.: Электроэнцефалографическое исследование высшей нервной деятельности. М., 1962, 263.
- Крылов С. С. Фармакологический и электрофизиологический анализ чувствительности химиорецепторных приборов каротидных клубочков. Автореф. дисс. Л., 1963.
- Крючкова В. А. 1-я Всесоюз. конф. по гигиене и токсикологии инсектофунгицидов. Киев, 1957, 66.
- Кузнецов С. Г. и Голиков С. Н. Синтетические атропиноподобные вещества. Л., 1962.
- Кулькова-Давиденкова Е. Ф. и Виленский Б. С. Невропатол. и психиатр., 1951, 6, 4—67.
- Кундиев Ю. И. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений, Медгиз, 1962, 206—214.
- Курева М. Т. Офтальмол. журн., 1957, 4, 234.
- Кухта В. К. В сб.: Токсикология и фармакология ядохимикатов. Минск, 1961, 47.
- Кучеренко Т. А. В кн.: Обезболивание в родах. АМН СССР, 1952, 93.
- Лазарев Н. В. (ред.). Руководство по фармакологии. Л., 1962.
- Левин С. С. В кн.: Экспериментальная и клиническая невропатология. Минск, 1953, 194—202.
- Ленкевич М. М. Фармакол. и токсикол., 1956, 6, 44.
- Лещинюк И. И. Фармакол. и токсикол., 1962, 5, 547.
- Лещинюк И. И. Фармакологическая характеристика четвертичных производных аминопиразола. Автореф. дисс., 1963.
- Линючев М. Н. и Саватеев Н. В. Тр. 10-й научной конф. ВМА им. С. М. Кирова, 1954, 57.
- Лисункин Ю. И. Фармакол. и токсикол., 1961, 2, 75.
- Лобзин В. С. Миастения, Л., 1960.
- Локтионов С. И. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 220—222.
- Лоцман Л. А. и Перельман Л. Б., 1940. Цит. по Н. Н. Аносову и М. А. Розину, 1956.
- Лошадкин Н. А. Дополнение к кн.: Б. Сондерс. Химия и токсикология органических соединений фосфора и фтора. М., 1961.
- Луганский Н. И. и Белоножко Г. А. В кн.: Организация медицинского обеспечения при массовых поражениях населения, Киев, 1957, 198.
- Любецкий Х. З. и др. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 69—74.
- Магазанник Л. Г. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957а, 210.
- Магазанник Л. Г. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957б, 228.
- Магазанник Л. Г. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957в, 230.
- Магазанник Л. Г. и Семенов И. В. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 545.
- Мак-Ильвейн Г. Биохимия и центральная нервная система. Пер. с англ. М., 1962, 336.
- Маковская Е. И. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 485—490.
- Марков С. М. и др. Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Менделеева, 1961, 6, 3, 357.
- Марков С. М. и др. Докл. АН СССР, 1962, 147, 2, 484.



- Маслова М. Н. и Розенгарт В. И. В сб.: Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы. Ереван, 1963, 153.
- Машковский М. Д. Фармакол. и токсикол., 1955, 4, 21.
- Машковский М. Д. и Брискин А. И. Фармакол. и токсикол., 1952, 5, 24.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства. М., 1962.
- Машковский М. Д. и Ильюченко Р. Ю. Тез. докл. 3-й конф. по вопросам электрофизиологии нервной системы. Киев, 1960, 268.
- Машковский М. Д. и Ильюченко Р. Ю. Журн. невропат. и психиат., 1961, 2, 166.
- Машковский М. Д. и Кругликова-Львова Р. П. Фармакол. и токсикол., 1951, 6, 27.
- Машковский М. Д. и Садритдинов Ф. Фармакол. и токсикол., 1962, 6, 685.
- Машковский М. Д. и Толстая М. А. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1950, 3, 244.
- Машковский М. Д. и др. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1950, 5, 370.
- Медведев Б. А. Мед. промышл. СССР, 1962, 5, 54.
- Медведь Л. И. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 5—17.
- Мещерякова А. В. Тр. Всесоюз. о-ва физиологов, биохимиков и фармакологов, 1954, 2, 189.
- Микеладзе Ш. В., 1954. Цит. по Дроздовой, 1957а.
- Миниович П. А. и Островская К. А. Клин. мед., 1951, 4, 65—69.
- Минюшева З. Ш., Неклесова И. Д. и Кудрина М. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 539.
- Михельсон М. Я. Физиол. журн. СССР, 1946а, 5, 635.
- Михельсон М. Я. Влияние наркотиков на активность холинэстеразы. Дисс., Л., 1946б.
- Михельсон М. Я. Действие наркотиков на холинэстеразу. Изд. ВМА. Л., 1948.
- Михельсон М. Я. Успехи совр. биол., 1948, 25, 3, 321.
- Михельсон М. Я. Акуш. и гинеко., 1951, 1, 16.
- Михельсон М. Я. Новости мед., 1952, 30, 61.
- Михельсон М. Я. (ред.) Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957.
- Михельсон М. Я. и др. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957а, 324.
- Михельсон М. Я. и др. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957б, 285.
- Михельсон М. Я. и др. V Междунар. биохим. конгресс. Рефераты секционных сообщений, т. 2. М., 1961а, 258.
- Михельсон М. Я. и др. В кн.: Руководство по фармакологии, т. 1. М., 1961б, 205.
- Михельсон М. Я. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. Изд. АН СССР, М., 1962, 437.
- Михельсон М. Я., Рожкова Е. К. и Саватеев Н. В. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1954, 2, 7.
- Муравьева З. М. Вопросы мед. хим., 1961, 7, 1, 97.
- Мшихин Н. М. Сб. науч. тр. Науч.-исслед. ин-та неврологии, нейрохирургии и физиотерапии МЗ БССР. Минск, 1951, IV, 131—149.
- Наумов С. Ф. В кн.: Совещание по физиологическим проблемам, посвящ. памяти И. П. Павлова. АМН СССР, М., 1948, 70.
- Нахманзон Д. В сб.: Проблемы эволюции функций и энзимохимии процессов возбуждения. М., 1961, 215.
- Неклесова И. Д. Биохимия, 1963, 28, 4, 67, 6.
- Неклесова И. Д. и Минюшева З. Ш. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 524.
- Немлихер Л. Я. Тр. Хабаровского мед. ин-та, 1952, 12, 147—153.

Новик  
Осипов  
АН  
Остап  
мед.  
Панин  
Панос  
21.  
Паньш  
Мин  
Паньш  
Панюк  
ван,  
Панюк  
134.  
Паско  
эстер  
Певзн  
Пелик  
1878  
Перел  
192.  
Перел  
Пермс  
Петро  
Петче  
Печен  
ловс  
Пирс  
Плени  
1961  
Плечк  
Покро  
Покро  
Покро  
Покро  
Покро  
т. I  
Покро  
Поляк  
Попов  
Порту  
Порту  
Порту  
Поска  
и  
Правд  
Прозо  
хол  
реф  
Прозо  
Пушк  
ка  
Рахма  
фор  
Реут  
1957



- Новикова А. А. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1940, 9, 1, 34.
- Осипова З. М. В кн.: Химия и применение фосфорорганич. соединений. АН СССР, 1962, 508.
- Остапович Г. Л. Сб. раб. клиники нервных болезней. Тр. Воронежского мед. ин-та, 1949, 18, 217—222.
- Панина Н. Б. Тр. Ленингр. сан.-гиг. мед. ин-та, 1960, 57, 110.
- Паносян Г. А. Изв. АН Арм. ССР. Биол. и сельскохоз. науки, 1958, 11, 6, 21.
- Паньшина Т. Н. В сб.: Токсикология и фармакология ядохимикатов. Минск, 1961, 68.
- Паньшина Т. Н. Фармакол. и токсикол., 1963, 26, 4, 476.
- Панюков А. Н. Третья Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы. Ереван, 1963, 531.
- Панюков А. Н. Тез. докл. 1-го Всесоюз. биохим. съезда. М.—Л., 1963, в. II, 134.
- Пасков Д. С. Фармакологическая характеристика нивалина как антихолинэстеразного средства. Автореф. дисс. Л., 1958.
- Певзнер Ф. В. Фармакол. и токсикол., 1955, 2, 27.
- Пеликан Е. А. Руководство к токсикологии, составленное по Рабюто. СПб., 1878, 230.
- Перельман Л. Б. В сб.: Неврология военного времени. М., 1949, 2, 181—192.
- Перельман Л. Б. и др. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1962, 53, 5, 76.
- Пермская В. А. Акуш. и гинеко., 1955, 1, 17.
- Петров-Маслаков А. М. Обезболивание в родах, АМН СССР, 1952, 98.
- Петченко А. И. Цит. по М. Я. Михельсону, 1962.
- Печенкин В. А. Материалы 9-го Всесоюз. фармакологической конф. Свердловск, 1961, 190.
- Пирс Э. Гистохимия. М., 1962.
- Пленина Г. Н. В сб.: Токсикология и фармакология ядохимикатов. Минск, 1961, 72.
- Плечкова Е. К. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 1963, 1, 24.
- Покровский А. А. Фармакол. и токсикол., 1948, 1, 42.
- Покровский А. А. Фармакол. и токсикол., 1950, 1, 35.
- Покровский А. А. Вопр. мед. химии, 1958, 4, 4, 292.
- Покровский А. А. Военно-мед. журн., 1960, 1, 34.
- Покровский А. А. В сб.: Актуальные вопросы современной биохимии. т. II, 1962, 203.
- Покровский А. А. и Пономарева Л. Г. Биохимия, 1961, 26, 2, 276.
- Поляков-Станкевич Н. Г. Тр. ВМА им. С. М. Кирова, 1938, 17, 143.
- Попова Э. Н. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1961, 2, 72.
- Португалов В. В. Очерки физиологии нервных окончаний. М., 1955.
- Португалов В. В. и Яковлев В. А. Докл. АН СССР, 1951, 78, 1021.
- Португалов В. В. и Яковлев В. А. Вопр. мед. химии, 1953, 5, 188.
- Поскаленко А. Н. В кн.: Новые лекарственные средства в эксперименте и клинике. Л., 1958, 29.
- Правдич-Неминская Т. В. Докл. АН СССР, 1949, 65, 3, 405.
- Прозоровский В. Б. Проблема антагонизма холинотенезибилизирующих и холинолитических средств у животных различного пола и возраста. Автореф. дисс. Л., 1960.
- Прозоровский В. Б. Физиол. журн. СССР, 1960, 5, 623.
- Пушкина Н. Н. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 81—83.
- Рахматулин Н. М. и Сироткин В. М. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений, АН СССР, 1962, 468.
- Реут Н. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 313.



- Ржевская Г. Ф. В сб.: Материалы общепитутской конференции. Ка-  
зань, 1960, 559.
- Ржевская Г. Ф. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соедине-  
ний. М., 1962, 453.
- Рожкова Е. К. и др. В кн.: Химия и применение фосфорорганических  
соединений. М., 1962, 463.
- Розенгарт В. И. Докл. АН СССР, 1960, 133, 1223.
- Розенгарт В. И. V Междунар. биохим. конгресс. Рефераты секционных  
сообщ., т. 1. М., 1961, 289.
- Розенгарт В. И. В сб.: Актуальные вопросы современной биохимии. М.,  
1962, 47.
- Розенгарт В. И. и Карташева Н. В. Биохимия, 1959, 24, 627.
- Розенгарт В. И. и Маслова М. Н. Докл. АН СССР, 1956, 109, 6, 1176.
- Розенгарт В. И. и Шепшелевич Л. В. Биохимия, 1962, 27, 4, 689.
- Розенгарт В. И. и Шепшелевич Л. В. Конф по механизму и кинети-  
ке ферментативного катализа. М., 1963, 20.
- Розовская С. Б. Офтальм. журн., 1959, 3, 154.
- Русских В. В. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника  
отравлений, М., 1962, 247—250.
- Рыболовлев Р. С. Фармакол. и токсикол., 1952, 6, 30.
- Саватеев Н. В. Труды ВММА, Л., 1956, 55, 438.
- Саватеев Н. В. В кн.: Физическая роль ацетилхолина и изыскание новых  
лекарственных веществ. Л., 1957а, 40.
- Саватеев Н. В. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание  
новых лекарственных веществ. Л., 1957б, 49.
- Савшинская А. В. Цит. по З. А. Дроздовой, 1957.
- Салеев В. Н. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений.  
АН СССР, 1957, 372.
- Самойлов А. Ф. Сб., посвящ. 75-летию акад. И. П. Павлова. Л., 1924, 75.
- Самойлов А. Ф. В сб.: *Naturwissenschaft in der Soviet Union*. Berlin, 1929.  
Избр. статьи и речи. М., 1946, 191.
- Санин П. И., Шер В. В. и Глуходед И. С. В кн.: Химия и применение  
фосфорорганических соединений. М., 1962, 383.
- Сапир И. Д. и др. Тр. III Всесоюз. съезда невропатол. и психиат. Медгиз.  
1950, 422—424.
- Сарда Л., Денюэль П. V Междунар. биохим. конгресс. Симпозиум IV.  
М., 1962, 56.
- Селиванова А. Т. В кн.: Проблема механизмов фармакологических реак-  
ций. Рига, 1957, 105.
- Селиванова А. Т. В кн.: 18-е совещ. по проблемам высшей нервной дея-  
тельности. Л., 1958, 131.
- Селиванова А. Т. и Лазуко Н. Н. Материалы IX Всесоюз. фармаколо-  
гической конф. Свердловск, 1961, 233.
- Селиванова А. Т. и Лазуко Н. Н. Фармакол. и токсикол., 1963, 1, 3.
- Семенов И. В. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание  
новых лекарственных веществ. Л., 1957, 237.
- Семенов И. В. Материалы о бронхоспазме, вызываемом фосфорорганиче-  
скими веществами. Автореф. дисс. Л., 1958.
- Семенов И. В. и Фруентов Н. К. В кн.: Физиологич. роль ацетилхоли-  
на и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 245.
- Семенов И. В. и Фруентов Н. К. Сб. трудов кафедры судебной мед.  
I Ленингр. мед. ин-та, 1958, 2, 183.
- Синицын С. Н. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и кли-  
ника отравлений. М., 1962, 223—229.
- Склярова Т. У. Журн. невропатол. и психиатр., 1962, 2, 239.
- Сметанкин Г. Н. В кн.: Материалы Поволожской конференции физиоло-  
гов, биохимиков и фармакологов. Куйбышев, 1957, 234.
- Смусин Я. С. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание но-  
вых лекарственных веществ. Л., 1957, 153.



- Смусин Я. С. Сб. трудов кафедры судебной мед I Ленингр. мед. ин-та. Л., 2, 187.
- Соколовский В. В. Цитология, 1959, 1, 4, 431.
- Соколовский В. В. и Королев Н. В. Цитология, 1959, 1, 177.
- Соловьев А. И. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 515.
- Сондерс Б. Химия и токсикология органических соединений фосфора и фтора. М., 1961.
- Сорохтин Г. Н. Бюлл. exper. биол. и мед., 1945, 19, 3, 73.
- Сорохтин Г. Н. Тез. докл. III Всесоюз. съезда невропатологов и психиатров. М., 1948, 153.
- Сорохтин Г. Н. Тр. III Всесоюз. съезда невропатол. и психиатров. Медгиз, 1950, 419.
- Сорохтин Г. Н. Атония нервного центра. Медгиз, 1961.
- Сорохтин Г. Н. и Минут-Сорохтина О. П. Эзерин в лечении органических заболеваний нервной системы. 1946.
- Сорохтин Г. Н. и Позняков Ф. Е. Бюлл. exper. биол. и мед., 1948, 1, 33.
- Сорохтин Г. Н. и Рейзин М. С. Бюлл. exper. биол. и мед., 1948, 2, 148.
- Сорохтин Г. Н. и Супруненко А. С. Тр. Хабаровского мед. ин-та, 1952, 12, 12.
- Сосновик И. Л. Сб. науч. тр. Витебского гос. мед. ин-та, 1950, 3, 121—127.
- Спыну Е. И. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957а, 336.
- Спыну Е. И. Фармакол. и токсикол., 1957б, прил. 49.
- Спыну Е. И. Гиг. и сан., 1959, 11, 26.
- Спыну Е. И. По Фаерману И. С. и др., 1962.
- Стацек Н. К. В кн.: Гигиена и токсикол. новых пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 229.
- Степанов А. А. и Попов В. Н. Химическое оружие и основы противохимической защиты, 1962.
- Степанский Г. А. Фармакол. и токсикол., 1958, 2, 83.
- Степанский Г. А. Фармакол. и токсикол., 1961, 3, 357.
- Тараховский М. Л. Бюлл. exper. биол. и мед., 1958, 45, 3, 72.
- Тиминская Г. Н. Здравоохр. Белоруссии, 1956, 9, 35.
- Тиминская Г. Н. Здравоохр. Белоруссии, 1959, 4, 22.
- Тиминская Г. Н. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 512.
- Тихомиров П. Е. и Троицкая О. А. В кн.: Вопросы фармакологии нервной системы, 1952, 145.
- Толстая М. А. и Машковский М. Д. Фармакол. и токсикол., 1950, 1, 27.
- Трефилов В. Н. и др. В кн.: Гигиена и токсикол. пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 53—59.
- Трошкова А. В. Офтальмол. журн., 1959, 3, 156.
- Трусов М. С. Тр. Хабаровск. мед. ин-та, 1959, 18, 209.
- Турпаев Т. М. Физиол. журн. СССР, 1953, 6, 732.
- Турпаев Т. М. и Нистратова С. Н. В сб.: Тиоловые соединения в медицине. Киев, 1959, 65.
- Турпаев Т. М. и Путинцева Т. Г. Физиол. журн. СССР, 1955, 1, 71.
- Турпаев Т. М. и Путинцева Т. Г. Фармакол. и токсикол., 1957, 2, 22.
- Турпаев Т. М., Путинцева Т. Г. и Нистратова С. Н. В сб. Проблемы эволюции функций и энзимохимии процессов возбуждения. М., 1961, 324.
- Умбрайт В. и др. Манометрические методы определения тканевого обмена. Пер. с англ. М., 1951.



- Успенская Е. П. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 219.
- Успенская Е. П. и Магазанник Л. Г. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 214.
- Устименко Л. Л. Вестн. офтальмол., 1956, 2, 11.
- Устименко Л. Л. Вестн. офтальмол., 1958, 4, 24.
- Файерман И. С. и др. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. М., 1962, 446—451.
- Федорчук Ю. Г. В кн.: Проблема механизмов фармакологических реакций. Рига, 1957, 118.
- Франков И. А. Сб. науч. работ Минск. мед. ин-та, 1959, 23, 132.
- Франков И. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 443.
- Харкевич Д. А. Ганглионарные средства. М., 1962.
- Хлусер Г. Р. Вестн. офтальмол., 1955, 4, 30.
- Цирк К. Г. В кн.: Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957, 174.
- Чернявский Г. Я. В кн.: Материалы II Всесоюз. конф. офтальмологов. Тбилиси, 1961, 104.
- Черномордик П. М. и др. Невропатол. и психиат., 1951, 1, 68—70.
- Чичин Х. Г. Сб. науч. работ Минского мед. ин-та, 1959, 124.
- Чичин Х. Г. Сб. науч. работ Минского мед. ин-та, 1960, 114.
- Чичин Х. Г. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. АН СССР, 1962, 490.
- Чугунова Л. В. Тр. I Всеросс. конф. акушеров и гинекол. Медгиз, 1958, 98.
- Чугунова Л. В. Казанск. мед. журн., 1959а, 6, 78.
- Чугунова Л. В. Казанск. мед. журн., 1959б, 3, 53.
- Чугунова Л. В. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 309.
- Шадурский К. С. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957, 309.
- Шарапов И. М. Фармакол. и токсикол., 1951, 3, 32.
- Шевелева В. С. Межнейронная передача возбуждения в симпатических ганглиях. Л., 1961.
- Шенк Н. А. и др. Фармакол. и токсикол., 1956, 4, 36.
- Шрадер Г. Успехи химии, 1953, 22, 6, 712.
- Шугаев Б. Б. Фармакол. и токсикол., 1957а, 2, 30.
- Шугаев Б. Б. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1957б, 301.
- Эйдельман Б. М. В кн.: Вопросы фармакологии вегетативной нервной системы. 1952, 155.
- Эйдинова М. Б. и Эдельштейн Э. А. Фармакол. и токсикол., 1951, 3, 36.
- Экклс Дж. Физиология нервных клеток. Пер. с англ. М., 1959.
- Юань Ли-юнь. Тр. Ленингр. сан.-гиг. мед. ин-та, 1961, 71, 203.
- Юсупова Д. Х. Казанск. мед. журн., 1958, 1, 47.
- Яковлев В. А. В кн.: Химия и применение фосфорорганических соединений. М., 1962, 424.
- Яковлев В. А. и Волкова Р. И. Докл. АН СССР, 1959, 128, 4, 843.
- Яковлев В. А. и Волкова Р. И. Докл. АН СССР, 1962, 146, 1, 217.
- Яковлев В. А. и Фруентова Т. А. Биохимия, 1963, 28, 5, 850.
- Яковлев В. А. и др. V Междунар. биохим. конгресс. Рефераты секционный сообщений, т. 1. М., 1961, 322.
- Якубов А. В. В кн.: Гигиена и токсикология новых пестицидов и клиника отравлений. Медгиз, 1962, 74—81.
- Янс Г. С. и др. V Междунар. биохим. конгресс. Симпозиум IV. М., 1962, 69.
- Ярешко И. Т. Цит. по И. С. Фаерману и др., 1962.

Aaron H.  
 Abraham  
 Adams D.  
 Adams D.  
 Adams D.  
 Adams D.  
 Adie P.  
 Adie P.  
 Adie P.  
 Adie P.  
 Adie P.  
 1956, 3  
 Adie P.  
 Adie P.  
 Admira  
 Adrian  
 56.  
 Aeschli  
 Ahmed  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Aldridg  
 Alexan  
 Alles G.  
 Altami  
 Ammon  
 Ammon  
 198.  
 Anders  
 Apriso  
 4, 13  
 Apriso  
 Arano  
 457.  
 Arnold  
 Arthur  
 Ashbol  
 Askew  
 Askew  
 Askew  
 Askew  
 Aspere  
 Aspere  
 Aspere  
 Atanas  
 Atanas  
 Atanas  
 1951,  
 Augens  
 August  
 August  
 August  
 August



- Aaron H. S. a. oth. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 456.
- Abrahams V. C., Koelle G. B., Smart P. J. Physiol., 1957, 139, 137.
- Adams D. H. Biochim. Biophys. Acta, 1949, 3, 1.
- Adams D. H., Whittaker V. P. Biochim. Biophys. Acta, 1949a, 3, 358.
- Adams D. H., Whittaker V. P. Biochem. J., 1949b, 44, 62.
- Adams D. H., Whittaker V. P. Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 543.
- Adie P. A. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1956a, 34, 3, 654.
- Adie P. A. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1956b, 34, 6, 1091.
- Adie P. A. Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1, 15.
- Adie P. A., Hoskin F. C. G., Trick G. S. Canad. J. Biochem. Physiol., 1956, 34, 1, 80.
- Adie P. A., Tuba J. Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1, 21.
- Adie P. A., Tuba J. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 1, 70.
- Admiraal J., Myers D. K., van Houten J. C. Nature, 1955, 176, 468.
- Adrian E. D., Feldberg W., Kilby B. A., Brit. J. Pharmacol., 1947, 2, 56.
- Aeschlimann J. A., Reinert M. J. Pharmacol., 1931, 43, 413.
- Ahmed M. K. et al. J. Agric. Food. Chem., 1958, 6, 740.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1950, 46, 451.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1953a, 53, 62.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1953b, 54, 442.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1953c, 53, 110.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1953d, 53, 117.
- Aldridge W. N. Biochem. J., 1954, 56, 185.
- Aldridge W. N., Barnes J. M. Nature, 1952, 169, 345.
- Aldridge W. N., Davison A. N. Biochem. J., 1952a, 51, 62.
- Aldridge W. N., Davison A. N. Biochem. J., 1952b, 52, 663.
- Aldridge W. N., Davison A. N. Biochem. J., 1953, 55, 5, 763.
- Alexander J. a. oth. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2, 741.
- Alles G. A., Hawes R. C. J. Biol. Chem., 1940, 133, 375.
- Altamirano M. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 268.
- Ammon R. Pflügers Arch. ges. Physiol., 1933, 233, 486.
- Ammon R., Meyer H. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem., 1959, 314, 4—6, 198.
- Anderson H. K. J. Physiol., 1904, 31, 22.
- Aprison M. H. В кн.: Recent Advances biol. psychiatry. New York, 1962, 4, 133.
- Aprison M. N., Hathan P. Science, 1954, 119, 3083, 158.
- Aranow H. J., Hoefler P. F., Powland L. P. J. Chron. Dis., 1957, 6, 457.
- Arnold A. a. oth. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1954, 87, 2, 393.
- Arthur B. W., Casida J. E. J. Econ. Entomol., 1958, 51, 49.
- Ashbolt R. F., Rydon H. N. Biochem. J., 1957, 66, 2, 237.
- Askew B. M. Brit. J. Pharmacol., 1956a, 11, 4, 417.
- Askew B. M. Brit. J. Pharmacol., 1956b, 11, 4, 424.
- Askew B. M. Brit. J. Pharmacol., 1957, 12, 3, 340.
- Askew B. M., Dabies D. K., Green A. Z. Biochem. J., 1957, 66, 3, 43.
- Asperen K. J. Insect Physiol., 1959, 5, 3, 306.
- Asperen K. Biochem. Pharmacol., 1960, 3, 2, 136.
- Asperen K., Dekhuijzen H. M. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 3, 603.
- Atanackovic D. Arch. int. Pharmacodyn., 1950, 83, 277.
- Atanackovic D. Arch. int. Pharmacodyn., 1951, 85, 78.
- Atanackovic D., Dalgaard-Mikkelsen. Arch. int. Pharmacodyn., 1951, 85, 1.
- Augenstine L. Science, 1959, 129, 3350, 718.
- Augustinsson K. B. Acta physiol. Scand., 1948, 15, Suppl. 52, 1.
- Augustinsson K. B. Arch. Biochem., 1949, 23, 111.
- Augustinsson K. B. Acta chem. Scand., 1952, 6, 6, 959.
- Augustinsson K. B. Scand. J. Clin. a. Lab. Invest., 1955, 7, 4, 284.



- Augustinsson K. B. *Acta chem. Scand.*, 1957, 11, 8, 1371.  
 Augustinsson K. B. *Acta chem. Scand.*, 1958, 12, 6, 1286.  
 Augustinsson K. B. *Acta chem. Scand.*, 1959, 13, 3, 571.  
 Augustinsson K. B. В кн.: *Handbuch z. exper. Pharmakologie. Ergänzungswerk*, 1963, Bd. 15, 3, 89.  
 Augustinsson K. B. et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1959, 3, 68.  
 Augustinsson K. B., Ekedahl G. *Acta chem. Scand.*, 1962, 16, I, 240.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta physiol. Scand.*, 1953, 30, 1, 45.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta chem. Scand.*, 1954a, 8, 5, 753.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta chem. Scand.*, 1954b, 8, 5, 762.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta chem. Scand.*, 1954b, 8, 6, 915.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta chem. Scand.*, 1955a, 9, 2, 310.  
 Augustinsson K. B., Heimbürger G. *Acta chem. Scand.*, 1955b, 9, 3, 383.  
 Augustinsson K. B., Jousson G. *Acta chem. Scand.*, 1957, 11, 275.  
 Augustinsson K. B., Nachmansohn D. *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 543.  
 Austin Z., Davies D. *Brit. J. Pharmacol.*, 1954, 9, 2, 145.  
 Axelsson J., Thesleff S. *Acta physiol. Scand.*, 1958, 43, 15.  
 Bacq C. M. et al. *Pharmacodynamie Biochimique*. Paris, 1954.  
 Bagdon R. E., Dubois K. P. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1955, 103, 2-3, 192.  
 Bain J. A. *Am. J. Physiol.*, 1950, 160, 187.  
 Ball W. Z. a. oth. *Canad. J. Biochem. a. Physiol.*, 1954, 32, 4, 440.  
 Balotin N. M., Coon I. M. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1960, 123, 3-4, 395.  
 Banister J. a. oth. *J. Physiol.*, 1951, 115, 55.  
 Barlow R. B., Himms J. M. *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, 10, 173.  
 Barnes I. M. *Brit. J. Pharmacol.*, 1953, 8, 2, 208.  
 Barnes I. M. *Chem. a. Ind.*, 1954, 478.  
 Barnes I. M., Denz F. A. *J. Path. Bact.*, 1953, 65, 597.  
 Barnes I. M., Duff J. I. *Brit. J. Pharmacol.*, 1953, 8, 334.  
 Barnett R. J. *J. Cell. Biol.*, 1962, 12, 2, 247.  
 Barstad J. A. B. et al. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1959, 121, 395.  
 Bastide P. *Biol. med.*, 1962, 51, 4, 386.  
 Bayliss B. J., Todrick A. *Biochem. J.*, 1956, 62, 62.  
 Becker B. a. oth. *Amer. J. Ophthalm.*, 1959, 47, 635.  
 Becket S., Gelhorn E. *Amer. J. Physiol.*, 1948, 153, 113.  
 Bender M. L., Turnquest B. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957a, 79, 1652.  
 Bender M. L., Turnquest B. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957b, 79, 1656.  
 Benkensive D., Dyrberg V. *Acta anaesthesiol. Scand.*, 1962, 6, 1, 1.  
 Benoiton L. a. oth. *Nature*, 1960, 187, 596.  
 Benoiton L., Rydon H. N. *J. Chem. Soc. (Lond.)*, 1960, 3328.  
 Berends F. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 576.  
 Berglund F. et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1962, 11, 383.  
 Bergmann F. *Disc. Faraday Soc.*, 1955, 20, 126.  
 Bergmann F., Adv. in catalysis, 1958, 10, 131.  
 Bergmann F., Segal R. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 16, 513.  
 Bergmann F., Wurzel M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, 13, 251.  
 Bergmann F. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1950, 186, 693.  
 Bergmann F. a. oth. *Biochem. J.*, 1956, 63, 684.  
 Bergmann F. a. oth. *Biochem. J.*, 1958, 68, 493.  
 Bergmann M. *Zschr. Physiol. Chemie*, 1923, 131, 1.  
 Berkowitz E. C. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1955, 89, 3, 394.  
 Bernhard C. C., Scogl C. R. *Acta physiol. Scand.*, 1953, 29, 435.  
 Bernsohn J. *Neurology*, 1958, 8, Suppl. 1, 94.



- Bernsohn J. a. oth. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1961, 108, 1, 71.  
 Bernsohn J. a. oth. Nature, 1962, 195, 4838, 285.  
 Bernsohn J., Possley L. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1957, 95, 672.  
 Berry W. K. Biochem. J., 1950, 47, XXI.  
 Berry W. K. a. oth. Biochem. J., 1955, 59, 1, 1.  
 Berry W. K. a. oth. Brit. J. Pharmacol., 1959, 14, 186.  
 Bethe K. a. oth. Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol., 1957, 231, 1, 3.  
 Beznak A. V. Pflügers Arch. ges. Physiol., 1932, 229, 719.  
 Bhattacharya B. K., Atanackovic D. Arch. int. Pharmacodyn., 1956, 104, 275.  
 Bhattacharya B. K., Feldberg W. Brit. J. Pharmacol., 1958, 13, 163.  
 Bhattacharya B. K., Pocket A. Arch. int. Pharmacodyn., 1956, 107, 473.  
 Bhawe W. B. J. Physiol., 1958, 140, 169.  
 Bidstuvup P. Z., Bonnel J. A. Chem. a. Ind., 1954, 24, 674.  
 Biggs H. G. a. oth. Am. J. Clin. Pathol., 1958, 30, 2, 181.  
 Binenfeld Z. Arh. hig. rada, 1961, 12, 223.  
 Binenfeld Z. Vojno Sanit. Pregl., 1962a, 19, 2, 129.  
 Binenfeld Z. Bull. soc. chim. Beograd, 1962b, 27, 37.  
 Binenfeld Z. Bull. soc. chim. Beograd, 1962b, 27, 157.  
 Binenfeld Z. Bull. soc. chim. Beograd, 1962r, 27, 163.  
 Binenfeld Z., Vojvodic V. Arh. hig. rada, 1961, 12, 219.  
 Binenfeld Z. et al. Arh. hig. rada, 1961, 12, 207.  
 Blaber L. C., Creasey N. H. Biochem. J., 1960a, 77, 3, 591.  
 Blaber L. C., Creasey N. H. Biochem. J., 1960b, 77, 3, 597.  
 Blaber L. C., Cuthbert A. W. Biochem. Pharmacol., 1962, 11, Febr. 113.  
 Blaschko H. a. oth. Brit. J. Pharmacol., 1949, 4, 29.  
 Bloch H. Helv. chim. Acta, 1943, 26, 733.  
 Bloch H., Hottinger A., Zschr. Vitaminforsch., 1953, 13, 9.  
 Boell E. J., Nachmansohn D. Science, 1940, 92, 513.  
 Boissier J. R., Lesbros J. Ann. pharmac. Franç., 1962, 20, 2, 150.  
 Bonnet V., Bremer F. J. Physiol., 1937a, 90, 45.  
 Bonnet V., Bremer F. C. R. Soc. Biol., 1937b, 126, 1271.  
 Bonting S. L., Featherstone R. M. Arch. Biochem. Biophys., 1956, 61, 1, 89.  
 Bourne J. G. Brit. J. Anaesth., 1953, 25, 116.  
 Bourne J. G. a. oth. Lancet, 1952, 1, 1225.  
 Boursnell J. C., Webb E. C. Nature, 1949, 164, 875.  
 Bovet D. et al. C. R. Acad. Sci., 1946, 223, 597.  
 Bovet-Nitti F., Bovet D. Arch. exp. Path. Pharmacol., 1953, 220, 52.  
 Bowen R. A. Anaesthesia, 1960, 15, 3.  
 Bradley L. B., Elkes S. J. Physiol., 1953a, 5, 451.  
 Bradley P. B., Elkes S. J. Physiol., 1953b, 120, 14.  
 Bradley P. B., Cerquiglin S., Elkes S. J. Physiol., 1953, 121, 51.  
 Brady U. E., Arthur B. W. J. Econ. Entomol., 1961, 54, 6, 1232.  
 Brauer R. W. J. Pharmacol., 1948, 92, 162.  
 Bremer F., Chatonet J. Arch. int. Physiol., 1949, 57, 106.  
 Brisco G. Lancet, 1936, 1, 469.  
 Brisco S., Burn J. H. Brit. J. Pharmacol. a. Chemother., 1954, 9, 1, 42.  
 Brisco S. M. J. Physiol., 1954, 126, 623.  
 Brodie B. B. Sympos. Enzymes a. drug action, London, 1962, 317.  
 Bronk D. W. a. oth. Amer. J. Physiol., 1938, 122, 1.  
 Brooks C., Koizumi K., Siebens A. A. Am. J. Physiol., 1956, 184, 497.  
 Brouwer D. M. et al. Proc. Koninkl. nederl. acad. wet., 1957, 1360, 275.  
 Brown G. L., Feldberg W. J. Physiol., 1936, 88, 265.  
 Brown H. V., Bush A. T. Arch. ind. hyg. occup. med., 1950, 1, 6, 633.  
 Brown L. M. Biblioth. Anat., 1961, 2, 21.  
 Brown R. V., Kunkel A. M. J. Pharmacol., 1957, 120, 276.  
 Brown R. V., Somers X. M. Fed. Proc., 1956, 15, 1, 404.  
 Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 5444.



- Cohen J. A. a. oth. J. Comp. Physiol., 1959, 54, 231.  
 Cohen J. A., Posthumus C. H. Acta physiol. pharmacol. neerl., 1955, 4, 1, 17.  
 Cohen J. A., Posthumus C. H. Acta physiol. pharmacol. neerl., 1957, 5, 4, 385.  
 Cohen J. A., Warringa M. G. P. J. Biochim. Biophys. Acta, 1953a, 10, 195.  
 Cohen J. A., Warringa M. G. P. J. Biochim. Biophys. Acta, 1953b, 11, 52.  
 Cohen J. A., Warringa M. G. P. J. J. Clin. Invest., 1954, 33, 3, 459.  
 Cohen J. A., Warringa M. G. P. J. Biochim. Biophys. Acta, 1957a, 25, 3, 600.  
 Cohen J. A., Warringa M. G. P. J. Biochim. Biophys. Acta, 1957b, 26, 1, 29.  
 Cohen W., Erlanger B. F. J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 15, 3928.  
 Cohn E. J. a. oth. J. Am. chem. Soc., 1946, 68, 459.  
 Cohn E. J., Edsall J. T. Proteins, amino acids and peptides. New York, 1943.  
 Coleman I. W. a. oth. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1960, 38, 7, 667.  
 Coleman I. W., Little P. E., Bannard R. A. B. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1962, 40, 6, 815.  
 Coleman M. H., Eley D. D. Biochim. Biophys. Acta, 1962, 58, 231.  
 Collumbine H., Dirnhuber P. J. Pharm. a. Pharmacol., 1955, 7, 9, 580.  
 Comroe J. H. a. oth. Am. J. med. Sci., 1946, 212, 641.  
 Conley B. E. Arch. internat. Pharmacodyn., 1958, 116, 3—4, 375.  
 Cook J. W. J. Assoc. Off. Agr. Chemists, 1955, 38, 826.  
 Cook J. W. a. oth. J. Assoc. Off. Agr. Chemists, 1957, 40, 2, 664.  
 Cook J. W. a. oth. J. Assoc. Off. Agr. Chemists, 1958, 41, 399.  
 Cook J. W., Yip G. J. Assoc. Off. Agr. Chemists, 1958, 41, 407.  
 Couceiro A. N., Bales P. D., Frankel H. M. J. Pharmacol. exp. Therap., 1959, 127, 35.  
 Crevier M., Ball W. L., Kay K. Arch. Ind. Hyg., 1954, 9, 306.  
 Crevier M. Arch. internat. Physiol., 1958, 66, 4, 489.  
 Crook J. W. et al. J. Pharmacol. exp. Therap., 1962, 136, 3, 397.  
 Cunningham L. W. Science, 1957, 125, 1145.  
 Curtis D. R., Eccles R. M. J. Physiol., 1958, 141, 446.  
 Dahlbom R. et al. Acta pharmacol. toxicol., 1953, 9, 163.  
 Dale H. H., Feldberg W., Vogt M. J. Physiol., 1936, 86, 353.  
 Dallemagne M. J. B. kh.: Pharmacodynamie biochimique. Paris, 1954.  
 Daly M. Brit. J. Pharmacol. a. Chemother., 1957, 12, 4, 504.  
 Daly M., de Burgh, Wright P. G. J. Physiol., 1956, 133, 3, 475.  
 D'Arcy P. F., Taylor E. P. J. Pharmacy a. Pharmacol., 1962, 14, 3, 129.  
 Daufman W. C. a. oth. J. Agric. Food. Chem. 1959, 7, 188.  
 Davies D. R., Green A. Z. Biochem. J., 1956, 63, 4, 529.  
 Davies D. R., Green A. Z. Brit. J. Industr. Med., 1959, 16, 2, 128.  
 Davies D. R., Nichols J. D. Brit. Med. J., 1955, 4926, 1373.  
 Davies D. R., Rutland J. P. Nature, 1956, 178, 4535, 697.  
 Davison A. N. Biochem. J., 1953, 54, 583.  
 Davison A. N. Chem. a. Ind. (London), 1954, 895.  
 Davison A. N. Biochem. J., 1955a, 60, 2, 339.  
 Davison A. N. Biochem. J., 1955b, 61, 2, 203.  
 De H. N. Indian J. Med. Res., 1955, 43, 1, 71.  
 De Candole C. A. et al. Brit. J. Pharmacol., 1953, 8, 466.  
 De Candole C. A., McPhail M. K. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1957, 35, 11, 1071.  
 Deichmann W. B., Rakoszy R. Arch. industr. Hyg., 1953, 7, 152.  
 Dejardin M. C. R. Soc. Biol., 1954, 148, 21—22, 1898.  
 Delaunois A. L. Arch. int. Pharmacodyn., 1962, 140, 3—4, 351.  
 Depierre F. M., Funke A. C. R. Acad. Sci., 1954, 239, 4, 370.  
 Depierre F. M., Martin L. C. R. Acad. Sci., 1958, 246, 1, 183.  
 De Robertis E. a. oth. J. Neurochem., 1962, 9, 23.  
 Desmedt J. E. Acta neurol. Belg., 1956, 57, 94.



- Bruice T. C., Schmir G. L. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 63, 484.  
 Bruice T. C., Sturtevant J. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 30, 208.  
 Brun R., Favre F. *Dermatologica*, 1954, 108, 257.  
 Brunaud M., Navarro J. *Bull. Acad. veter. France*, 1953, 26, 7, 381.  
 Brunaud M., Navarro J. *C. R. Soc. Biol.*, 1955, 149, 13-14, 1500.  
 Bülbring E., Burn J. H. *J. Physiol.*, 1941, 100, 337.  
 Bull. World Health Organisation, 1957, 16, 1219.  
 Bullock K. *Chem. a. Ind.*, 1955, 2, 36.  
 Bullock K. *Biochem. J.*, 1956, 63, 3, 484.  
 Burgen A. S. V. *Brit. J. Pharmacol.*, 1949, 4, 219.  
 Burgen A. S. V., Chipman L. M. *J. Physiol.*, 1951, 114, 296.  
 Burgen A. S. V., Chipman L. M. *Quart. J. exp. Physiol.*, 1952, 37, 61.  
 Burgen A. S. V., Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, 6, 593.  
 Burgen A. S. V., Keele C. A., Slome D. J. *Pharmacol.*, 1949, 13, 291.  
 Burn J. H., Kottegoda S. R. *J. Physiol.*, 1953, 121, 360.  
 Callaway S., Davies D. R. *Brit. J. Pharmacol. a. Chemother.*, 1957, 12, 3, 382.  
 Calma Z., Wright S. J. *Physiol.*, 1944, 103, 93.  
 Camba R. et al. *Folia med.*, 1962, 45, 3, 229.  
 Campell H. S., Smith J. L. *Arch. Ophthalm.*, 1962, 67, 4, 501.  
 Cannon W. B., Rosenbluath A. T. *Am. J. Physiol.*, 1937, 119, 221.  
 Caraway W. T. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1956, 26, 8, 945.  
 Casida J. E. *Science*, 1955a, 122, 597.  
 Casida J. E. *Biochem. J.*, 1955b, 60, 487.  
 Casida J. E. *Science*, 1955c, 122, 597.  
 Casida J. E. *J. Agric. a. Food. Chem.*, 1956, 4, 9, 772.  
 Casida J. E. *J. Agric. a. Food. Chem.*, 1962, 10, 5, 370.  
 Casida J. E., Allen T. C., Stahmann M. A. *J. Biol. Chem.*, 1954, 210, 2, 607.  
 Casida J. E., Augustinsson K. B. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 36, 2, 411.  
 Casida J. E. et al. *J. Econ. Entomol.*, 1954, 47, 64.  
 Casida J. E. et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1963, 12, 1, 73.  
 Casier H., Wleschouwer C. R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1952, 90, 412.  
 Casseli F. *Arch. Ottal.*, 1953, 57, 413.  
 Casula D. et al. *Boll. Soc. ital. biol. sperim.*, 1960a, 36, 24, 1606.  
 Casula D. et al. *Boll. Soc. ital. biol. sperim.*, 1960b, 36, 24, 1603.  
 Casula D. et al. *Soc. ital. biol. sperim.*, 1961, 37, 11, 529.  
 Celice J. et al. *Therapie*, 1960, 15, 6, 1146.  
 Chaetfield P. O., Dempsey E. W. *Am. J. Physiol.*, 1942, 135, 633.  
 Chaetfield P. O., Lord I. T. *EEG a. Clin. Neurophysiol.*, 1955, 6, 287.  
 Chaetfield P. O., Purpura D. P. *EEG a. Clin. Neurophysiol.*, 1954, 6, 287.  
 Chary R., Bocquet P. J. *Physiol.*, 1958, 50, 2, 205.  
 Chary R. et al. *Bull. Acad. veter. France*, 1959, 32, 4, 225.  
 Chary R. et al. *Bull. Acad. veter. France*, 1951, 32, 4, 225.  
 Chennells M., Floyd W. F., Wright S. J. *Physiol.*, 1949, 108, 375.  
 Chennells M., Floyd W. F., Wright S. J. *Physiol.*, 1951, 114, 107.  
 Childs A. F., Davies D. R. et al. *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, 10, 4, 462.  
 Chou T. C., Elio F. I. *Brit. J. Pharmacol.*, 1948, 3, 113.  
 Chouteau J. et al. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 11, 1329.  
 Chow K. X., John E. R. *Science*, 1958, 128, 781.  
 Clanet F., Andre M. P. *Rev. med. Navale*, 1958, 13, 1-2, 139.  
 Clouet D. H., Waelch H. J. *Neurochem.*, 1961, 8, 201.  
 Clouet D. H., Waelch H. J. *Neurochem.*, 1963, 10, 1, 51.  
 Cohen B. S. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1956, 116, 2, 209.  
 Cohen J. A. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, 6, 469.  
 Cohen J. A. et al. *Discus. Faraday Soc.*, 1955a, 20, 114.  
 Cohen J. A. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955b, 18, 228.

Cohen J.  
 Cohen  
 1, 17.  
 Cohen  
 4, 38.  
 Cohen  
 Cohen  
 Cohen  
 Cohen  
 3, 60.  
 Cohen  
 29.  
 Cohen  
 Cohn E.  
 Cohn E.  
 Coleman  
 Coleman  
 Phys  
 Coleman  
 Collum  
 Comro  
 Conley  
 Cook J.  
 Cook J.  
 Cook J.  
 Cook  
 Gouce  
 rap.  
 Crevie  
 Crevie  
 Crook  
 Cunni  
 Curti  
 Dahlb  
 Dale  
 Dalle  
 Daly  
 Daly  
 D'Arc  
 Daut  
 Davie  
 Davie  
 Davie  
 Davie  
 Davie  
 Davie  
 De H  
 De C  
 De C  
 35  
 Deic  
 Deja  
 Dela  
 Dep  
 Dep  
 De R  
 Des



- Desmedt J. E. a. oth. J. Physiol., 1957, 136, 1, 20.  
 Desmedt J. E., Grütz G. J. Physiol., 1955, 129, 46.  
 Desmedt J. E., Franken L. EEG a. Clin. Neurophysiol., 1957, 7, 356.  
 Desnuelle P. Cahiers phys., 1960, 14, 124, 482.  
 Desnuelle P. B. кн.: Мечан. ondulat. et biol. molecu. Paris, 1961, 80.  
 Desnuelle P. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 570.  
 Desnuelle P., Constantin M. J., Sarda L. Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 4, 625.  
 Diamanth H., Edith H. Acta physiol. Scand., 1957, 39, 209.  
 Di Grutlola G., Fanuele H., Canani B. M. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1961, 37, 20, 1018.  
 Diggle W. M., Gage J. C. Biochem. J., 1951, 49, 491.  
 Dirnhuber P., Collumbine H. Brit. J. Pharmacol. a. Chemother., 1955, 10, 1, 12.  
 Dirnhuber P., Lovatt, Evans C. Brit. J. Pharmacol., 1954, 9, 441.  
 Dixon G. H. Am. J. Chem. Soc., 1958a, 80, 1260.  
 Dixon G. H. J. Biol. Chem., 1958b, 233, 1373.  
 Dixon G. H. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1956a, 19, 193.  
 Dixon G. H. et al. J. Am. Chem. Soc., 1956b, 78, 4810.  
 Dixon G. H., Neurath H. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4558.  
 Dixon M., Webb E. C. Enzymes. Longmans, London, 1960.  
 Dixon W. E., Brodie T. G. J. Physiol., 1903, 29, 97.  
 Domino E. F., Fox K. E., Brody T. M. J. Pharmacol. a. Exp. Therap., 1955, 114, 473.  
 Донеv Д. и др. Научн. тр. Выш. мед. ин-та. София, 1958, 4, 111—119.  
 Douglas W. W. J. Physiol., 1952, 117, 71.  
 Douglas W. W., Matthews P. B. J. Physiol., 1951, 114, 30.  
 Douglas W. W., Matthews P. B. J. Physiol., 1952, 116, 202.  
 Douglas W. W., Paton W. D. M. J. Physiol., 1954, 108, 375.  
 Drance S. M. Arch. Ophthalmol., 1959, 62, 4, 673.  
 Draper H. H., James M. F. et al. Fed. Proc., 1952, 11, 204.  
 Drill V. A. Pharmacology in Medicine. New York, 1958, 349.  
 Du Bois K. P., D'oull J., Coon J. M. J. Pharmacol., 1950, 99, 3, 376.  
 Du Bois K. P. a. oth. J. Pharmacol., exp. Therap., 1953, 107, 464.  
 Du Bois K. P. a. oth. J. Pharmacol. exp. Therap., 1957, 119, 208.  
 Du Bois K. P. A. M. A. Arch. Ind. Health, 1958, 18, 488.  
 Duensing F., Erdmann W. D. Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol., 1954, 233, 6, 506.  
 Dultz L., a. oth. J. Pharmacol., 1957, 119, 4, 522.  
 Dunpny E. B. Am. J. Ophthalm., 1949, 32, 399.  
 Durham W. F., Gaines T. B., Hayes W. J. A. M. A. Arch. Ind. Hyg., 1956, 13, 326.  
 Dussardier M. J. Phusiol., 1954, 46, 777.  
 Eadie G. S. a. oth. J. Pharmacol., 1948, 94, 19.  
 Earl C. J., Thompson R. S. H. Brit. J. Pharmacol., 1952, 7, 685.  
 Easson L. R., Stedman E. Proc. Roy. Soc. B., 1936, 121, 142.  
 Ebata M. et al. Biochem. biophys. Acta, Res. Commun., 1962, 9, 1—2, 173.  
 Eccles J. C. J. Physiol., 1935, 85, 2.  
 Eccles J. C. The physiology of nerve cells. Baltimore, 1957.  
 Eccles J. C., Eccles R. M., Fatt P. J. Physiol., 1956, 131, 154.  
 Eccles J. C., Fatt P., Koketsu K. J. Phusiol., 1954, 126, 524.  
 Eccles J., McFarlane F. W. J. Neurophysiol., 1949, 12, 59.  
 Edery H., Schatzberg-Porath G. Arch. internat. Pharmacodyn., 1960, 124, 1—2, 212.  
 Eglin J. M., 1953, Цит. по: X. Machne a. K. R. W. Unna, 1963.  
 Ehrenpreis E. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 44, 561.  
 Ehrenpreis S. Science, 1962a, 136, 3511, 175.  
 Ehrenpreis S. Nature, 1962b, 194, 4828, 586.  
 Eicken S. Ang. Chemie, 1954, 66, 17/18, 551.

Eickst  
Phar  
Elam J  
Elima  
Elsner  
Emme  
Emme  
Emme  
Emme  
Enand  
Enand  
Enand  
Enand  
Endre  
Engel  
Enge  
Epstei  
Eränk  
Erdma  
519.  
Erdma  
Erdma  
Erdma  
Erdma  
Erdma  
124,  
Eto M.,  
Evans  
Evans  
Evans  
Fahrne  
Fahrne  
Fatt P.  
Feldb  
Feldb  
Feldbe  
Feldb  
Ciba  
Feldbe  
Feldb  
Feldbe  
Fenwil  
Fenwi  
Ferna  
Ferrar  
Ferrar  
Fische  
Fische  
Fleisc  
Fleish  
1958,  
Fleish  
Fleish  
1958  
Fleish  
Flesch  
Flodwa



- Eickstedt R. W., Erdman W. D., Schaefer K. P. Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol., 1955, 226, 5, 435.
- Elam J. O. a. oth. U. S. Armed. Forces Med. J., 1956, 7, 797.
- Ellman G. L. et al. Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 2, 88.
- Elsner P. Wien. klin. Wschr., 1955, 67, 40, 793.
- Emmelin N., Jacobsohn D. Acta physiol. Scand., 1945, 9, 97, 111.
- Emmelin N., Murev A. Acta physiol. Scand., 1950, 20, 13.
- Emmelin N., Strömblad B. C. Acta physiol. Scand., 1957, 38, 319.
- Emmelin N., Strömblad B. C. Brit. J. Pharmacol., 1958a, 13, 193.
- Emmelin N., Strömblad B. C. J. Physiol., 1958b, 143, 506.
- Enander I. Acta chem. Scand., 1958, 12, 4, 780.
- Enander I. et al. Biochem. Pharmacol., 1961a, 7, 3—4, 226.
- Enander I. et al. Biochem. Pharmacol., 1961b, 7, 3—4, 232.
- Enander I. et al. Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 377.
- Endre S. Punjob. Med. J., 1957, 6, 10, 406.
- Engelhard H., Erdmann W. D. Klin. Wschr., 1963, 41, 525.
- Engelhardt E., Loewi O. Arch. exp. Path. a. Pharmacol., 1930, 150, 1.
- Epstein M. A., Freeman G. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1956, 92, 660.
- Eränkő O. a. oth. Nature, 1962, 193, 4817, 778.
- Erdmann W. D., Schaefer K. P. Arch. exp. Path. Pharmacol., 1954, 223, 519.
- Erdmann W. D. u. and. Arch. exp. Path. Pharmacol., 1955, 225, 359.
- Erdmann W. D., Heye D. Arch. exp. Path. Pharmacol., 1958, 232, 3, 507.
- Erdmann W. D., Zandle Z. Ergebnisse inn. Med. Kinderheilk., 1958, 10, 104.
- Erdmann W. D. u. and. Dtsch. med. Wschr., 1958, 83, 32, 1359.
- Erdmann W. D., Dieter O. Arch. Toxicol., 1960, 18, 3, 151.
- Erdmann W. D., Burkhardt K. Arch. internat. Pharmacodyn., 1960, 124, 3—4, 409.
- Eto M., Casida J. E., Eto T. Biochem. Pharmacol., 1962 11, 337.
- Evans C., Lowatt J. Physiol., 1951, 114, 6.
- Evans F. T. a. oth. Brit. med. J., 1953, 1, 136.
- Evans C., Lovatt, Smith D. T. G. Proc. Roy. Soc. Edinb. 1956, 145, 61.
- Fahrney D. E., Gold A. M. J. Am. Chem. Soc., 1963a, 85, 349.
- Fahrney D. E., Gold A. M. J. Am. Chem. Soc., 1963b, 85, 997.
- Fatt P., Katz B. J. Physiol., 1952, 117, 109.
- Feldberg W. Physiol. Reviews, 1945, 25, 4, 596.
- Feldberg W. Arch. internat. Physiol., 1952, 49, 544.
- Feldberg W., Gaddum J. H. J. Physiol., 1933, 80, 12.
- Feldberg W., Gray J. A. B., Perry W. L. M. B KH.: The spinal cord, Ciba Found. Symp. London, 1953, 222.
- Feldberg W., Sherwood S. L. J. Physiol., 1954, 125, 488.
- Feldberg W., Vartiainen A. J. Physiol., 1934, 83, 103.
- Feldberg W., Vogt M. J. Physiol., 1948, 107, 372.
- Fenwick M. L. Biochem. J., 1958, 70, 3, 373.
- Fenwick M. L. a. oth. Biochem. J., 1957, 65, 1, 58.
- Fernander A. Arch. int. Pharmacodyn., 1949, 80, 82.
- Ferrara L., Vidili F., Aletti L. Minerva anesthesiol., 1961, 27, 2, 74.
- Ferrari W. Nature, 1957, 180, 4577, 144.
- Fischer E. H. a. oth. J. Biol. Chem., 1959, 234, 7, 1698.
- Fischetti B. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1957, 33, 10—12, 1388.
- Fleischer J. H. a. oth. J. Pharmacol., 1960, 129, 31.
- Fleisher J. H., Corrigan J. P., Howard J. W. Brit. J. Pharmacol., 1958, 13, 291.
- Fleisher J. H., Howard J. W., Corrigan J. P. Fed. Proc., 1958a, 17, 221.
- Fleisher J. H., Howard J. W., Corrigan J. P. Brit. J. Pharmacol., 1958b, 13, 288.
- Fleisher J. H., Jandorf B. J. Fed. Proc., 1952, 11, 212.
- Flesch R. Zschr. ges. innere Med., 1958, 13, 11, 375.
- Flodwark S., Wramner T. Acta physiol. Scand., 1945, 1, 88.



Foldes F. F. a oth. J. Pharmacol., 1958, 122, 457.  
 Forbat A. a oth. Lancet, 1953, 2, 1067.  
 Foulhoux N. C. R. Soc. Biol., 1958, 152, 7, 1116.  
 Fournell J. C. R. Soc. Biol., 1957, 151, 1373.  
 Fournier J. et al. Arch. Mal. prof., 1961a, 22, 3, 108.  
 Fournier J. Arch. Mal. prof., 1961b, 22, 1—2, 55.  
 Frada G., Gucciardi G. Med. lav., 1958, 49, 2, 81.  
 Francis C. M. J. Physiol., 1953, 120, 3, 435.  
 Frawley J. P., Hagan E. C., Fitzung O. G. J. Pharmacol., a. exp. Ther., 1952, 105, 156.  
 Fredriksson T. Acta physiol. Scand., 1957a, 42, Suppl. 145, 47.  
 Fredriksson T. Arch. internat. Pharmacodyn., 1957b, 113, 101.  
 Fredriksson T. Arch. internat. Pharmacodyn., 1958a, 115, 4, 474.  
 Fredriksson T. Acta dermat.-venerol., 1958b, 38, 41, 83.  
 Fredriksson T. J. Investig. Dermatol., 1962, 38, 4, 233.  
 Fredriksson T. et al. Acta dermat.-venerol., 1961a, 41, 5, 344.  
 Fredriksson T. et al. Acta dermat.-venerol., 1961b, 41, 5, 353.  
 Fredriksson T., Bigelow J. K. Arch. Envir. Health, 1961, 2, 6, 663.  
 Fredriksson T., Farrior W. L., Witter R. F. Acta dermat.-venerol., 1961, 41, 5, 335.  
 Fredriksson T., Tibbling S. Biochem. Pharmacol., 1959, 2, 4, 285.  
 Freedman A. M., Bales P. D., Wills A., Himwich H. E. Amer. J. Physiol., 1949, 153, 117.  
 Freedman A. M., Himwich H. B. Am. J. Physiol., 1948, 153, 121.  
 Freeman G., Epstein A. New Engl. J. Med. 1955, 253, 7, 266.  
 Fried G. H., Antopol W. J. Appl. Physiol., 1957, 11, 1, 25.  
 Friess S. L., Baldridge H. D. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 2482.  
 Fukuto T. R. a oth. J. Econ. Entomol., 1955, 48, 347.  
 Fulton M. P., Mogeys G. A. Brit. J. Pharmacol., 1954, 9, 2, 138.  
 Funckes A. Arch. Envir. Health, 1960, 1, 5, 404.  
 Funderbruck W. H., Case T. J. J. Neurophysiol., 1947, 10, 3, 179.  
 Funderbruck W. H., Case T. J. EEG a. Clin. Neurophysiol., 1951, 3, 213.  
 Funke A. et al. C. R. Acad. Sci., 1952, 234, 762.  
 Funke A., et al. C. R. Acad. Sci., 1954, 239, 3, 329.  
 Funke A., Benoit G., Jacob J. C. R. Acad. Sci., 1955, 240, 26, 2575.  
 Furnica M., Furnica G. Studii si cercetari biochim. Acad. RPR, 1961, 4, 3, 387.  
 Gaddum J. H. Nature, 1953, 841, 4384.  
 Gage J. C. Biochem. J., 1953, 54, 426.  
 Gal E. M., Roth F. Clin. chim. Acta. 1957, 2, 4, 316.  
 Gardiner J. E., Kilby B. A. Biochem. J., 1950, 46, XXXII.  
 Gerebtzoff M. A. C. R. Soc. Biol., 1955, 149, 7—8, 823.  
 Gero A., Withrow C. L. Nature, 1957, 180, 4598, 1354.  
 Gershom S., Shaw F. H. Lancet, 1961, 1, 7191, 1371.  
 Gesell R., Frey J. S. Am. J. Physiol., 1950, 160, 375.  
 Gesell R., Hansen E. T., Worzian J. J. Am. J. Physiol., 1942, 136, 776.  
 Gesell R., Hansen E. T. Am. J. Physiol., 1943, 144, 126.  
 Giacobini E. J. Neurochem., 1957, 1, 3, 234.  
 Giacobini E. Acta physiol. Scand., 1959a, 45, 311.  
 Giacobini E. Acta physiol. Scand., 1959b, 45, Suppl. 156.  
 Giacobini E. Acta physiol. Scand., 1959c, 45, 2—3, 238.  
 Giacobini E., Zajicek J. Nature, 1956, 177, 185.  
 Gilman A., Goodman L. S. Am. J. Physiol., 1955, 188, 2, 321.  
 Gioia A., Morpurgo C. J. Pharmacol., 1958, 13, 4, 467.  
 Gittler R. Wien. med. Wschr., 1959, 109, 42, 806.  
 Gjone E., Skramstad K. H. Acta pharmacol. toxicol., 1955, 11, 1, 94.  
 Gladner J. A., Laki K. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 1263.  
 Click D. J. Biol. Chem., 1938, 125, 729.  
 Gold A. J. a oth. Am. J. Physiol., 1957, 188, 2, 321.

Goldberger  
 Gomori G.  
 Goodman  
 York, 19  
 Gottlieb  
 Goutier  
 Goutier  
 Goutier  
 Grant W.  
 Grant W.  
 Green A.  
 Green A.  
 Green A.  
 Green A.  
 Green A.  
 Green A.  
 Green V.  
 Gregoire  
 Gregoire  
 Gregoire  
 Greig M.  
 Gribetz J.  
 Grob D. A.  
 Grob D., C.  
 87, 107.  
 Grob D., H.  
 Grob D., H.  
 Grob D., J.  
 Grob D., J.  
 115.  
 Grob D., L.  
 Grossman  
 Grouchy  
 Grundfest  
 Gunter C.  
 Gutfreund  
 Gutfreund  
 Haase J. 2  
 Hackley E.  
 Hackley  
 Halcutt M.  
 Hall G. E.  
 Halmann  
 Hamburg  
 Hamer H.  
 Hampson  
 Hanson R.  
 Hargreaves  
 Hargreaves  
 Harnack E.  
 Harrestrup  
 5, 129.  
 Harris J.  
 Harris H.  
 Hartley I.  
 Hartley E.  
 Harvey A.  
 Harwood  
 Hase E. J.



- Goldberger M. *Acta Anat.*, 1961, 46, 3, 185.  
 Gomori G. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, 68, 354.  
 Goodman L. S.; Gilman A. *The pharmacol. basis of therapeutics*. New-York, 1955.  
 Gottlieb R. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1894, 33, 261.  
 Goutier R. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 19, 3, 524.  
 Goutier R., Goutier-Pirotte M. *Arch. int. Physiol.*, 1954, 62, 151.  
 Goutier R., Goutier-Pirotte M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 16, 361.  
 Grant W. M. A. M. A. *Arch. Ophthalmol.*, 1948, 39, 579.  
 Grant W. M. *Pharmacol. Reviews*, 1955, 7, 2, 143.  
 Green A. L. a. oth. *J. Chem. Soc.*, 1958, 1583.  
 Green A. L., Nicholls J. D. *Biochem. J.*, 1959, 72, 1, 70.  
 Green A. L., Saville B. J. *J. Chem. Soc.*, 1956, 3887.  
 Green A. L., Smith H. J. *Biochem. J.*, 1957, 66, 3, 42P.  
 Green A. L., Smith H. J. *Biochem. J.*, 1958a, 68, 1, 28.  
 Green A. L., Smith H. J. *Biochem. J.*, 1958b, 68, 1, 32.  
 Green V. A., Davis J. E. *Fed. Proc.*, 1956, 15, 431.  
 Gregoire J. et al. *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1955a, 37, 1, 65.  
 Gregoire J. et al. *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1955b, 37, 1, 81.  
 Gregoire J. et al. *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1956, 38, 1, 147.  
 Greig M. E., Mayberry T. C. *J. Pharmacol.*, 1951, 102, 1.  
 Gribetz J., Goodman A. J. a. oth. *N. Y. State J. Med.*, 1960, 60, 24, 3996.  
 Grob D. *Arch. int. Med.* 1956, 98, 221.  
 Grob D., Garlick W. L., Harvey A. M. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1950, 87, 107.  
 Grob D., Harvey A. M. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1949, 84, 532.  
 Grob D., Harvey J. C. J. *Clin. Invest.*, 1958, 37, 350.  
 Grob D., Johns R. J. *JAMA*, 1958, 166, 15, 1855.  
 Grob D., Johns R. J., Harvey A. M. *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 1956, 99, 115.  
 Grob D., Lilienthal J. L. a. oth. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1947, 81, 217.  
 Grossman S. P. *Science*, 1960, 132, 301.  
 Grouchy J. *Rev. franç. études clin. et biol.*, 1958, 3, 881.  
 Grundfest H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, 66, 573.  
 Gunter C., Allen C. R. J. *Appl. Physiol.*, 1959, 14, 901.  
 Gutfreund H. *Trans. Farad. Soc.*, 1955, 51, 441.  
 Gutfreund H., Sturtevant J. M. *Biochem. J.*, 1956, 63, 656.  
 Haase J. Z. et al. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1957, 232, 274.  
 Hackley B. E. a. oth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 3651.  
 Hackley B. E. a. oth. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 80, 210.  
 Halcuit M. M. *New Engl. J. Med.*, 1955, 235, 24, 1075.  
 Hall G. E., Lucas C. C. J. *Pharmacol.*, 1937, 59, 34.  
 Halmann M. J. *J. Chem. Soc.*, 1959, 305.  
 Hamburger W. E. *Fed. Proc.*, 1951, 10, 305.  
 Hamer-Hodges R. J., Harkness J. *Brit. med. J.*, 1954, 2, 18.  
 Hampsson J. L., Essig C. a. oth. *EEG a. clin. Neurophysiol.*, 1950, 2, 41.  
 Hanson R. W., Rydon H. N. *Nature*, 1962, 193, 4821, 1182.  
 Hargreaves A. B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, 57, 1, 41.  
 Hargreaves A. V. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 67, 641.  
 Harnak E., Witkowski Z. *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, 1876, 5, 401.  
 Harrestrup-Anderson A., Jersild T. *Acta pharmacol. toxicol.*, 1949, 5, 129.  
 Harris J. I., Hartley B. S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 1, 201.  
 Harris H. a. oth. *Nature*, 1962, 196, 4861, 1296.  
 Hartley B. S. *Biochem. J.*, 1956, 64, 278.  
 Hartley B. S., Kilby B. A. *Nature*, 1950, 166, 784.  
 Harvey A. M. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1939, 65, 223.  
 Harwood C. T., Mason J. W. *Amer. J. Physiol.*, 1956, 186, 34, 45.  
 Hase E. J. *Biochem. (Japan)*, 1952, 39, 259.



- Hauschild F. *Pharmakologie und Grundlagen d. Toxikologie*, Leipzig, 1960.  
Hawkins R. D., Schild H. O. *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, 6, 682.  
Hawkins R. D., Mendel M. *Biochem. J.*, 1949, 44, 260.  
Hazard R., Delga J. *J. Physiol. (Paris)*, 1954a, 46, 2, 585.  
Hazard R., Delga J. *C. R. Soc. Biol.*, 1954b, 148, 5—6, 429.  
Hazard R., Delga J. *C. R. Soc. Biol.*, 1954b, 148, 9—10, 870.  
Heath D. F. *J. Chem. Soc.*, 1956, 3796.  
Heath D. F. *Organophosphorus poisons*. Pergamon Press. Oxford — London — New York — Paris, 1961.  
Heath D. F., Vandekar M. *Biochem. J.*, 1957, 67, 187.  
Heath D. F. a. oth. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 1955, B239, 191.  
Heathcote R. S. A. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1932, 44, 95.  
Heidenhain R. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1872, 5, 309.  
Heilbronn E. *Acta chem. Scand.*, 1959, 13, 8, 1547.  
Heilbronn E. *Acta chem. Scand.*, 1961, 15, 6, 1386.  
Heilbronn E. *Acta chem. Scand.*, 1962a, 16, 2, 516.  
Heilbronn E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962b, 58, 222.  
Heilbronn E. *Biochem. Pharmacol.*, 1963, 12, 1, 25.  
Heinicke R. M., Mori R. *Science*, 1959, 129, 3364, 1678.  
Hellman K., *J. Physiol.*, 1951, 115, 51P.  
Hellman K. *Nature*, 1952, 169, 113.  
Helmecky L., Nagy E. *Acta med. Hung.*, 1954, 5, 109.  
Herzfeld E., Stumpf Ch. *Wien. klin. Wschr.*, 1955, 67, 45, 874.  
Hestrin S. *J. Biol. Chem.*, 1949, 180, 249.  
Heymans C. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 1194.  
Heymans C. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1950, 81, 230.  
Heymans C. et al. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1953, 96, 209.  
Heymans C., Jacob J. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1947, 74, 233.  
Heymans C., Pochet A., van Houtte H. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1956, 104, 3—4, 293.  
Heyndrickx A., Vercruysse A. *Meded. dandbouwhoge school en opzoeeningstat. stat. Gent.*, 1961, 26, 3, 1500.  
Hine C. H., Dunlap M. K. et al. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1956, 116, 227.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, 6, 21.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1952, 7, 223.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1954a, 9, 2, 159.  
Hobbiger F. *Chem. a. Ind.*, 1954b, 52, 1574.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, 10, 3, 356.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1956, 11, 3, 295.  
Hobbiger F. *Bioch. J.*, 1957a, 66, 1, 7.  
Hobbiger F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1957b, 12, 438.  
Hobbiger F. a. oth. *Nature*, 1958, 182, 4950, 1672.  
Hobbiger F., Sadler P. W. *Brit. J. Pharmacol.*, 1959, 14, 192.  
Hodgson E., Casida J. E. *J. Agric. a. Food. Chem.*, 1962, 10, 3, 208.  
Hofstee H. J. *J. Pharmacol.*, 1960, 128, 3, 299.  
Hokin M. R., Hokin L. E. *J. biol. Chem.*, 1953, 203, 967.  
Holaday D. A., Kaniip K., Koelle G. B. *J. Pharmacol. a. exp. Therap.*, 1951, 111, 2, 241.  
Holland W. C., Brigg A. H. *Amer. J. Physiol.*, 1959, 168, 546.  
Holmes R. a. oth. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1953, 46, 799.  
Holmes R., Robins E. L. *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, 10, 4, 490.  
Holmstedt B. *Acta physiol. Scand.*, 1951, 25, suppl. 90.  
Holmstedt B. *Acta physiol. Scand.*, 1957a, 40, 4, 322.  
Holmstedt B. *Acta physiol. Scand.*, 1957b, 40, 331.  
Holmstedt B. *Pharmacol. Rev.*, 1959, 11, 3, 567.  
Holmstedt B. In *Handbuch d. exp. Pharmacol. Ergänzungswerk*, 1963, 15, 428.  
Holmstedt B., Scoglund C. R. *Acta physiol. Scand.* 1953, 29, 410.  
Holmstedt B., Sjöqvist F. *Acta physiol. Scand.*, 1957, 42, Suppl., 145.  
Holmstedt B., Sjöqvist F. *Biblioth. anat.*, 1961, 2, 1.

Holm  
Hörv  
Hosk  
Hosk  
Hosk  
Hunt  
Hurl 21  
Hutt  
Hutt  
Hyde  
Inf  
Jacob  
Jacob  
Jacob  
Jacob  
Jacob  
Jacob  
Jand  
Jand  
Jand  
Jand  
Jand  
Jand  
Janse  
Jans  
Jans  
Janse  
Janse  
Jansz  
Jans  
Jans  
Jans  
Jantz  
Jaqu  
Jnoci  
Joha 4,  
John  
Jorda 766  
Kalov  
Kaloy  
Kals  
Kami  
Karc  
Karcz  
Karcz 263  
Karcz  
Karol  
Katz  
Kaufn 793  
Kaul  
Kenn  
Ketel  
Keusl  
Kewit



- Holmstedt B., Toschi G. *Acta physiol. Scand.*, 1959, 47, 2-3, 280.  
 Hörven J. *Acta ophthalm.*, 1962, 40, 2, 153.  
 Hoskin F. C. G. *Canad. J. Biochem. a. Physiol.*, 1956, 34, 1, 75.  
 Hoskin F. C. G. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1963, 113, 320.  
 Hoskin F. C. G., Trick G. S. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1955, 33, 6, 963.  
 Hunt W. H. J. *Pharmacol. exp. Therap.*, 1947, 91, 298.  
 Hurley H. J., Shelley W. B., Koelle G. B. *J. Invest. Dermat.*, 1953, 21, 139.  
 Hutter O. F., Kostial K. *J. Physiol.*, 1953, 120, 53.  
 Hutter O. F. *J. Physiol.*, 1952, 117, 241.  
 Hyde S. a. oth. *J. Neurophysiol.*, 1949, 12, 17.  
 Infantellina F. *Arch. Sci. biol. (Bologna)*, 1955, 39, 209.  
 Jacob J. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1955, 101, 4, 446.  
 Jacob J., Dechavassine M. *Experientia*, 1956, 12, 11, 434.  
 Jacob J., Funke A. C. R. *Acad. Sci.*, 1953, 237, 25, 1809.  
 Jacob J., Marszak I. a. oth. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1952, 91, 303.  
 Jacobi C., Naunin-Schmied. *Arch. exp. Parh. Pharmac.*, 1891, 29, 171.  
 Jacobsohn K., Azevedo M. D. C. R. *Soc. Biol.*, 1962, 156, 1, 202.  
 Jandorf B. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 15, 3686.  
 Jandorf B. J. *J. Agric. a. Food. Chem.*, 1956a, 4, 10, 853.  
 Jandorf B. J. a. oth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 1521.  
 Jandorf B. J. a. oth. *Disc. Farad. Soc.*, 1955a, 20, 134.  
 Jandorf B. J. a. oth. *Fed. Proc.*, 1955b, 14, 231.  
 Jandorf B. J., McNamara P. J. *Pharmacol.*, 1950, 98, 77.  
 Jansen E. F., Balls A. K. *J. Biol. Chem.*, 1952, 194, 721.  
 Jansen E. F., Laurence A., Balls A. K. *J. Biol. Chem.*, 1951, 190, 557.  
 Jansen E. F. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1949a, 179, 189.  
 Jansen E. F. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1949b, 179, 201.  
 Jansen E. F. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 209.  
 Jansz H. S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959a, 33, 387.  
 Jansz H. S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959b, 33, 396.  
 Jansz H. S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959c, 34, 573.  
 Jansz H. S., Cohen J. A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 56, 531.  
 Jantzen G. *Dtsch. med. Wschr.*, 1951, 76, 1601.  
 Jaques R. *Helv. physiol. et pharmacol. Acta*, 1954, 12, 2, 24.  
 Jnoci Reizo. *Folia pharmacol. Jap.*, 1959, 55, 1, 13.  
 Johannesson Th., Lausen H. H. *Acta pharmacol. toxicol.*, 1961, 18, 4, 398.  
 Johnson R. P., Gold A. J. *Amer. J. Physiol.*, 1958, 192, 3, 581.  
 Jordan W. K., Badal D. W., March R. *Arch. neurol. psychiat.*, 1950, 63, 766.  
 Kalow W., Genest K. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1957, 35, 339.  
 Kaloynova-Simeinova F. *Activ. norv. super.*, 1961, 3, 3, 284.  
 Kalsbeck F. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, 5, 548.  
 Kamijo K., Koelle G. B. *J. Pharmacol. a. exp. Therap.*, 1952, 105, 3, 329.  
 Karczmar A. G. a. oth. *Toxicol. a. Appl. Pharmacol.*, 1962, 4, 2, 133.  
 Karczmar A. G., Howard J. W. *J. Pharmacol.*, 1955, 113, 30.  
 Karczmar A. G., Koppányi T. *Arch. exp. Pathol. Pharm.*, 1953, 219, 3, 263.  
 Karczmar A. G., Long J. P. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1958, 123, 3, 230.  
 Karoly K. *Szemeszet*, 1961, 98, 1, 18.  
 Katz S. *Am. J. Physiol.*, 1957, 189, 2, 311.  
 Kaufman S., Neurath H., Schwert G. W. *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 793.  
 Kaulla K., Holmes J. H. *Arch. Envir. Health*, 1961, 2, 2, 168.  
 Kennard D. W. *The spinal cord symposium. Boston*, 1953, 214.  
 Ketelaar J. A. *Rec. Trav. Chim.*, 1950, 69, 649.  
 Keusler C. I., Elsner R. W. *J. Pharmacol.*, 1951, 102, 196.  
 Kewitz H. *Arch. Biochem. a. Biophys.*, 1957a, 66, 2, 263.



- Kewitz H. *Klin. Wschr.*, 1957, 35, 10, 521.
- Kewitz H., Nachmansohn D. *Arch. Biochem. a. Biophys.*, 1957, 66, 2, 271.
- Kewitz H., Wilson I. B. *Arch. Biochem. a. Biophys.*, 1956, 60, 1, 261.
- Kewitz H., Wilson I. B., Nachmansohn D. *Arch. Biochem. a. Biophys.*, 1956, 64, 2, 456.
- Kiermeier F. u. and. *Naturwissenschaften*, 1961, 48, 4, 99.
- Kiermeier F. u. and. *Biochem. Zschr.*, 1962, 336, 5, 421.
- Kilby B. A. *Research*, 1949, 2, 9, 417.
- Kilby B. A. *Chem. a. Ind.*, 1954, 19, 524.
- Kilby B. A., Kilby M. *Brit. J. Pharmacol.*, 1947, 2, 234.
- King T. O., Poulsen E., Rovati L. A. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1957, 110, 1, 77.
- Kirby A. H. M., Neuberger A. *Biochem. J.*, 1938, 32, 1146.
- Kissel J. W., Domino E. F. *J. Pharmacol. a. Exp. Ther.*, 1957, 119, 157.
- Kitz R., Wilson I. B. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 10, 3245.
- Kleinfeld M., Majin J., Stein E. *Circulat. Res.*, 1960, 8, 1, 240.
- Klotzsche C. *Wien. klin. Wschr.*, 1955, 71, 48.
- Klupp H. et al. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1953, 96, 161.
- Klupp H. et al. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1955, 101, 2, 205.
- Koelle G. B. *J. Pharmacol.*, 1951, 103, 153.
- Koelle G. B. *J. Comp. Neurol.*, 1954, 100, 211.
- Koelle G. B. *J. Neuropath.*, 1955a, 14, 23.
- Koelle G. B. *XX Congr. internat. de physiol. Resumes*, 1956, 512.
- Koelle G. B. *Science*, 1957a, 125, 1195.
- Koelle G. B. *J. Pharmacol.*, 1957b, 120, 488.
- Koelle G. B. *Nature*, 1961, 140, 208.
- Koelle G. B. *J. Pharmacy a. Pharmacol.*, 1962, 14, 2, 65.
- Koelle G. B. *Heffter-Heubner Handbuch d. exp. Pharmakologie*, 1963, Suppl. 15, 187.
- Koelle G. B., Friedenwald J. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, 70, 617.
- Koelle G. B., Gilman A. J. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 435.
- Koelle G. B., Gilman A. *J. Pharmacol. rev.*, 1949, 95, 166.
- Koelle G. B., Koelle E. S., Friedenwald J. S. *J. Pharmacol.*, 1950, 100, 180.
- Koelle G. B., Steiner E. C. *J. Pharmacol.*, 1956, 118, 420.
- Koelle W. A., Koelle G. B. *J. Pharmacol.*, 1959, 126, 1, 1.
- Koenig E., Koelle G. B. *J. Neurochem.*, 1961, 8, 3—4, 169.
- Kolb E. *Zbl. Veterinärmed.*, 1957, 4, 10, 967.
- Kolmodin G. M., Scoglund C. R. *Acta physiol. Scand.*, 1953, 29, 503.
- Kondritzer A. A. *U. S. Armed. Forces Med. J.*, 1956, 7, 6, 791.
- Koppányi T., Karczmar A. G. *J. Pharmacol.*, 1951, 101, 327.
- Kordik P. a. oth. *Brit. J. Pharmacol.*, 1952, 7, 67.
- Koster R. J. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1946, 88, 39.
- Koster H., Kisch B. *Exp. Med. Surg.*, 1943, 1, 71.
- Котев Г. *Изв. отделения биол. и мед. наук Българ. АН* 1959a, 3, 2, 21.
- Котев Г. *Изв. отделения биол. и мед. наук Българ. АН*, 1959b, 3, 2, 61.
- Köver A. et al. *Acta physiol. Hung.*, 1957a, 11, 3—4, 253.
- Köver A. et al. *Acta physiol. Hung.*, 1957b, 11, 3—4, 259.
- Kowzett H., Rössler R. *Arch. exp. Path. a. Pharm.*, 1940, 195, 71—74.
- Kramer B. *Biochem. Pharmacol.*, 1962, 11, 299.
- Kramer D. N., Gamson R. M. *Anal. Chem.*, 1958, 30, 2, 251.
- Krantz J. C., Carr C. J. *The pharmacologic principles of medical practice*. Baltimore, 1958.
- Kraup O. et al. *Arch. exp. Path. Pharmak.*, 1955a, 225, 1—2, 117.
- Kraup O. et al. *Arch. intern. Pharmacodyn.* 1955b, 102, 3, 281.
- Krech D. M. a. oth. *J. Comp. physiol. Psychol.*, 1956, 49, 261.
- Krishna N., Leopold I. H. *Amer. J. Ophthalm.*, 1960, 49, 270.
- Krishna N., Leopold I. H. *Amer. J. Ophthalm.*, 1961, 52, 4, 565.



- Kristiansen K., Courtois G. EEG a. Clin. Neurophysiol., 1949, 1, 265.  
 Krivoy W., Marrazzi A. S. Fed. Proc., 1951, 10, 316.  
 Krivoy W., Hart E. R., Marrazzi A. S. J. Pharmacol., 1951, 103, 351.  
 Krop S., Kunkel A. M. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1954, 89, 3, 530.  
 Krueger H. R. a. oth. J. Agr. Food. Chem., 1959, 7, 182.  
 Krupka R. M., Laidler K. J. J. Am. Chem. Soc., 1961a, 83, 6, 1445.  
 Krupka R. M., Laidler K. J. J. Am. Chem. Soc., 1961b, 83, 6, 1448.  
 Krupka R. M., Laidler K. J. J. Am. Chem. Soc., 1961c, 83, 6, 1454.  
 Krupka R. M., Laidler K. J. J. Am. Chem. Soc. 1961d, 83, 6, 1458.  
 Kubistova J. Arch. internat. Pharmacodyn., 1959, 118, 3—4, 308.  
 Kunkel H. G., Ward S. M. J. exp. Med., 1947, 86, 325.  
 Kunkel A. M., Wills J. H., Monier J. S. Proc. Soc. exp. Biol., 1956, 92, 529.  
 Laidler K. J. Trans. Farad. Soc., 1955, 51, 550.  
 Landgren S., Liljestrand G., Zotterman Y. Acta physiol. Scand., 1952, 26, 2—3, 264.  
 Lands A. M. a. oth. J. Pharmacol., 1957, 119, 541.  
 Lands A. M. a. oth. J. Pharmacol., 1958, 123, 121.  
 Lange W., Krüger G. Berl. deutsch. chem. Ges., 1932, 65, 1598.  
 Lapor J. Gyermekgyógyászat, 1955, 6, 12, 383.  
 Larsson L. Acta chem. Scand., 1952, 6, 1470.  
 Larsson L. Svensk. kem. Tidskr., 1958, 70, 10, 405.  
 Lasslo A. a. oth. J. Med. Pharmac. Chem., 1960, 11, 6, 617.  
 Lawler H. C. J. Biol. Chem., 1959, 234, 799.  
 Lawler H. C. J. Biol. Chem., 1961, 236, 8, 2296.  
 Lawler H. C. J. Biol. Chem., 1963, 238, 1, 132.  
 Lawson W. B., Schramm H. J. J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 10, 2017.  
 Lehmann H., Liddell J. B. кн.: Modern trends in anaesthesia, ed by F. T. Evans a. T. C. Gray. London, 1961, 164.  
 Lehmann H., Ryan E. Lancet, 1956, 2, 124.  
 Lehmann H., Silk E. Brit. med. J., 1953, 1, 767.  
 Lehmann H., Silk E. Biochem. J., 1955, 59, VII.  
 Lenoling M., Slobody L. B., Mestern J. Amer. J. Physiol., 1959, 197, 2, 465.  
 Leopold J. H. Arch. Ophthalm., 1948, 40, 176.  
 Leopold J. H., Comroe J. H. Arch. Ophthalm., 1946a, 36, 17.  
 Leopold J. H., Comroe J. H. Arch. Ophthalm., 1946b, 36, 1.  
 Leopold J. H., Cleveland A. F. Am. J. Ophthalm., 1953, 36, 226.  
 Leopold J. H., Krishna N. Am. J. Ophthalm., 1961, 52, 4, 526.  
 Leopold J. H., McDonald P. R. Arch. Ophthalm., 1948, 40, 188.  
 Lesic R., Varagio V. J. Pharmacol., 1961, 16, 1, 99.  
 Lesny J., Vojta V. EEG a. Clin. Neurophysiol., 1960, 12, 742.  
 Leveque J et al. Maroc. med., 1961, 40, 431, 405.  
 Levin A. P., Jandori B. J. J. Pharmacol., 1955, 11, 2, 206.  
 Lewis J. R. et al. Arch. int. Pharmacodyn., 1955, 102, 4, 371.  
 Liley A. W. J. Physiol., 1956, 132, 650.  
 Liljestrand G. Acta physiol. Scand., 1951, 24, 225.  
 Limperos G., Ranta K. Science, 1953, 117, 3043, 453.  
 Linderström-Larg K., Glick D. C. R. Lab. Carlsberg. ser. chim., 1938, 22, 300.  
 Linn J. G., Tomarelli R. C. Am. J. Ophthalm., 1952, 35, part. II, 46.  
 Linnitz F. Med. Mschr., 1959, 13, 9, 579.  
 Liska St., Hajzokova M. Pracovni lec., 1958, 10, 5, 409.  
 Loewi O., Pflügers Arch. ges. Physiol., 1921, 189, 239.  
 Loewi O., Navratil E. Pflügers Arch. ges. Physiol., 1926, 214, 678.  
 Lohs K. Synthetische Gifte. Berlin, 1958.  
 Long J. P. et al. Pharmacol., Gist., 1960, 2, 88.  
 Long J. P. B. кн.: Hefter Handbuch d. exp. Pharmakol. Ergänzungswerk. Berlin, Bd. 15, 1963, 5, 374.



- Long J. P., Schueler F. W. J. Amer. Pharmac. Soc., 1954, 43, 2, 79.
- Longo V. G., Nachmansohn D., Bovet D. Arch. int. Pharmacodyn., 1960, 123, 3-4, 282.
- Longo V. G., Napolitano L. Arch. int. Pharmacodyn., 1954, 99, 2, 215.
- Loomis T. A. J. Pharmacol. exp. Therap., 1956, 118, 1, 123.
- Lora-Tamayo M. et al. Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 5-6, 501.
- Low H., Tammelin L. E. Acta physiol. Scand., 1951, 23, 78.
- Lubinska L. a. oth. J. Neurochem., 1963, 10, 1, 25.
- Lundholm L. Acta physiol., Scand., 1949, 16, 4, 345.
- Luzzatto A., Ramelli E. Acta neurol., 1962, 17, 1, 50.
- Macfarlane D. W. a. oth. J. Pharmacol., 1950, 100, 382.
- Machne X., Unna K. R. W. B. kn.: Heffter. Handbuch d. exp. Pharmakol. Ergänzungswerk. Berlin, 1963, Bd. 15, 5, 679.
- MacIntosh F. C. Canad. J. Biochem. a. Physiol., 1959, 37, 2, 343.
- MacIntosh F. C., Oborin P. E. Abstr. Int. physiol. Congr. Montreal, 1953, 580.
- Mackworth J. F., Webb E. C. Biochem. J., 1948, 42, 91.
- Magnus I. A., Thompson R. H. Brit. J. Dermat., 1954, 66, 163.
- Main A. R. Biochem. J., 1916a, 79, 2, 246.
- Main A. R. a. oth. Biochem. J., 1916b, 78, 4, 769.
- Majno G., Karnovsky M. L. J. Neurochem., 1961, 8, 1, 1.
- Malmejac J. Actualites pharmacol., 1953, 6, 141.
- Malmotröm B. G. et al. Acta chem. Scand., 1956, 10, 1077.
- Maly E., Janok J. Pracovni lek., 1956, 8, 6, 408.
- Mamo J. G., Leopold I. H. Amer. J. Ophthalm., 1958, 46, 724.
- Marchis-Mouren G. et al. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 83, 309.
- Marhold J. Pracovni lek., 1959, 11, 6, 308.
- Marrazzi A. S., Jawic N. E. Fed. Proc., 1947, 6, 354.
- Mason K., Ghiron C. A. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 2, 377.
- Massey V., Hartley B. S. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 361.
- Mastuda T. Acta Soc. ophthal. Jap., 1959, 63, 155.
- Masuda T. J. Biochem., 1959, 46, 11, 1489.
- Matsulara H., Nishimura S. J. Biochem., 1958, 45, 503.
- Maurico K. Am. J. Ophthalm., 1960, 50, 1, 115.
- Mazella H., Migliaro E. Arch. int. Pharmacodyn., 1949, 80, 79.
- Mazur A. J. Biol. Chem., 1946, 164, 271.
- Mazur A., Bodansky O. J. Biol. Chem., 1946, 163, 261.
- McCombie H., Saunders B. Nature, 1946, 157, 476.
- McCaulley J., Cook J. W. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 1959, 42, 1, 197.
- McDonald C. E., Balls A. K. J. Biol. Chem., 1957, 229, 1, 69.
- McIsaac R. J., Koelle G. B. J. Pharmacol., 1959, 126, 1, 9.
- McLean P. D. Psychosom. Med., 1955, 17, 355.
- McLean P. D. A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat., 1957, 78, 128.
- McMeekin T. L. J. Biol. Chem., 1942, 128, 66.
- McNamara B. P. a. oth. J. Pharmacol. exp. Therap., 1946, 88, 27.
- McNamara B. P. a. oth. J. Pharmacol. exp. Therap., 1954, 110, 2, 232.
- McNamara B. P. a. oth. Fed. Proc., 1951, 10, 321.
- McOsker D. E., Daniel L. J. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 79, 1.
- McPhail M. K., Adie P. A. Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, 38, 9, 945.
- Medakovic M., Varagio V. J. Pharmacol., a. Chemother., 1957, 12, 1, 24.
- Meer C. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 263.
- Meer C., Meeter E. Acta physiol. et pharmacol. (Amsterdam), 1956, 4, 4, 454.
- Meeter E. J. Physiol., 1958, 144, 38.
- Mehrotra K. N., Dauterman W. C. J. Neurochem., 1963, 10, 119.
- Mendel B., Myers D. K. et al. Brit. J. Pharmacol., 1953, 8, 2, 217.
- Mendez R., Ravin A. J. Pharmacol. exp. Ther., 1941, 72, 80.
- Merlis J., Lawson H. J. Neurophysiol., 1939, 2, 566.



- Metz B. *Am. J. Physiol.*, 1958, 192, 101.
- Meyer A., Wilbrandt W. *Helv. physiol. et pharmacol.*, 1954, 12, 3, 206.
- Michaelis A. *Ann. der. Chemic.*, 1876, 181, 265.
- Michaelis M. a. oth. *Am. J. Physiol.*, 1949, 157, 463.
- Michaelis M. a. oth. *J. Pharmacol., exp. Therap.*, 1954, 111, 169.
- Michel H. O. *J. Lab. a. Clin. Med.*, 1949, 34, 1564.
- Michel H. O. *Biochem. J.*, 1953, 54, 3, XXIV.
- Michel H. O. *Fed. Proc.*, 1955, 14, 255.
- Michel H. O., Kroop S. *J. Biol. Chem.*, 1951, 190, 119.
- Michenfelder J. D. a. oth. *Anesth. a. Analg. cur. Res.*, 1961, 40, 4, 397.
- Miller F. R. *J. Physiol.*, 1937, 91, 212.
- Miller K. D., van Vunakis H. *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 1, 227.
- Millo A., Porcellati G. *Ital. J. Biochem.*, 1961, 10, 5, 333.
- Milosevic M. et al. *Arh. hig. rada*, 1959, 10, 213.
- Milosevic M. et al. *Voj. San. Progled*, 1960, 17, 5, 525.
- Milosevic M. P. et al. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1961, 132, 1—2, 180.
- Milstein C., Sanger F. *Biochem. J.*, 1961, 79, 3, 456.
- Minz B. *The role of humore agents in nervous activity*. Paris, 1955.
- Miquel O. *J. Pharmacol.*, 1946, 28, 67.
- Mitchell G. *Brit. J. Cancer*, 1953, 7, 313.
- Modell W., Kroop S. *J. Pharm. exp. Therap.*, 1946, 88, 1, 34.
- Möller E. B. *Nord. med.*, 1954, 52, 1405.
- Moruzzi G. *L'epilepsia sperimentale*. Ed. N. Zanichelli. Bologna, 1946.
- Mounter L. A. *J. Biol. Chem.*, 1954, 209, 2, 813.
- Mounter L. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1957a, 226, 2, 867.
- Mounter L. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1957b, 226, 2, 873.
- Mounter L. A., Cheatham R. M. *Enzymologia*, 1963, 25, 4, 215.
- Mounter L. A., Dien L. H. *J. Biol. Chem.*, 1956, 219, 685.
- Mounter L. A., Floyd C. S., Chanttin A. *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 221.
- Mounter L. A., Shipley B. A. *J. Biol. Chem.*, 1958, 231, 2, 855.
- Mounter L. A., Tuck K. D. *J. Biol. Chem.*, 1956, 221, 1, 537.
- Mounter L. A., Whittaker V. P. *Biochem. J.*, 1953, 53, 167.
- Munkner T. et al. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1961, 18, 2, 170.
- Murphy S. D., DuBois K. P. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1957, 96, 813.
- Murphy S. D., DuBois K. P. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1958, 124, 3, 194.
- Murtha E. F. et al. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1955, 115, 291.
- Myers D. K. *Biochem. J.*, 1953, 55, 67.
- Myers D. K. *Biochem. J.*, 1956, 62, 557.
- Myers D. K., Kemp A. *Nature*, 1954, 173, 33.
- Myers D. K., Schotte A. a. oth. *Biochem. J.*, 1955, 61, 3, 521.
- Nachmansohn D. *J. Biol. Chem.*, 1947, 171, 715.
- Nachmansohn D. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 9—10, 1021.
- Nachmansohn D. *Chemical a. molecular basis of nerve activity*. Acad. Press. New York—London, 1959.
- Nachmansohn D., Lederer E. *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1939, 21, 797.
- Nachmansohn D., Rothenberg M. A. *Science*, 1944, 100, 454.
- Nachmansohn D., Rothenberg M. A. *J. Biol. Chem.*, 1945, 158, 653.
- Nachmansohn D., Rothenberg M. A., Feld E. A. *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 247.
- Nachmansohn D., Wilson I. B. *Adv. Enzymol.*, 1951, 12, 259.
- Nachmansohn D. a. oth. *J. Biol. Chem.*, 1949, 180, 875.
- Naess K. *Acta pharmacol. toxicol.*, 1956, 12, 154.
- Namba T., Hiraki K. *JAMA*, 1958, 166, 1834.
- Nathan P., Aprison M. H. *Fed. Proc.*, 1955a, 14, 106.
- Nathan P., Aprison M. H. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955b, 18, 150.
- Naughton M. A. a. oth. *Biochem. J.*, 1960, 77, 149.
- Nelson W. L., Barnum C. P. *J. Neurochem.*, 1960, 6, 1, 43.
- Nesheim E. D., Cook J. W. *J. Assoc. Offic. Agric. Chemists*, 1959, 42, 1, 187.



- Neubert D., Schaefer J. Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 1958, 233, 151.  
Ninagawa K. J. Juzen Med. Soc., 1958, 60, 4, 652.  
Oberst F. W., Christensen M. K. J. Pharmacol. exp. Ther., 1956, 116, 2, 216.  
O'Brien R. D. Canad. J. Biochem. Physiol., 1965, 34, 1131.  
O'Brien R. D. Canad. J. Biochem. Physiol., 1957a, 35, 45.  
O'Brien R. D. J. Econ. Entomol., 1957b, 50, 159.  
O'Brien R. D. Nature, 1959, 183, 121.  
O'Brien R. D. a. oth. J. Econ. Entomol., 1958, 51, 714.  
O'Brien R. D., Davison A. N. Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 11, 1203.  
O'Brien R. D., Spencer E. Y. J. Arg. Food. Chem., 1955, 3, 56.  
Okinaka A. J. et al. J. Pharmacol. exp. Therap. 1954, 112, 2, 231.  
O'Leary J. F., Kinkel A. M., Jones A. H. J. Pharmacol. a. exp. Ther., 1961, 132, 1, 50.  
Oosterbaan R. A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 27, 549.  
Oosterbaan R. A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1958a, 27, 549.  
Oosterbaan R. A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1958b, 27, 556.  
Oosterbaan R. A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 204.  
Ord M. G., Thompson R. H. S. Biochem. J., 1950, 46, 346.  
Ord M. G., Thompson R. H. S. Biochem. J., 1952, 51, 245.  
Osswald H. Zschr Krebsforsch., 1955, 60, 4, 514.  
Page S. G., Haag J. H., Freund J. Exp. medicine, 1953, 21, 17, 125.  
Palmer A. C. J. Physiol, 1959, 149, 1, 209.  
Pandit K., Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 3386.  
Pani A. Folia med., 1961, 44, 2, 155.  
Park J. et al. J. Biol. Chem., 1961, 236, 1, 136.  
Parkes M. W., Sacra P. Brit. J. Pharmacol., 1954, 9, 299.  
Parmar S. et al. Canad. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 9, 1335.  
Patchornik A. et al. J. Chem. Soc., 1958, 80, 4747.  
Pateisky K. Wien. Zschr. Nervenheilk., 1959, 17, 1, 53.  
Pateisky K., Kraupp O., Stumpf Ch. Wien. klin. Wschr., 1955, 67, 32, 578.  
Paton W. D. M., Zaimis E. J. Brit. J. Pharmacol., 1949, 4, 381.  
Paton W. D. M., Zaimis E. J. Pharmacol. Rev., 1952, 4, 219.  
Paulet G. Acta int. Pharmacodyn., 1954, 27, 2, 157.  
Paulet G. J. Physiol. (France), 1956, 48, 5, 915.  
Paulet G., Andre P. J. Physiol. (France); 1957, 49, 1, 335.  
Paulet G., Clanet F. C. R. Soc. Biol., 1957, 151, 1, 129.  
Paulet G., Coq H. Arch. int. Pharmacodyn., 1958, 112, 1—2, 8.  
Paulet G., Marsol H., Coq H. J. Physiol. (France), 1957, 49, 1, 342.  
Plapinger R. E., Owens O. O. J. Organ. Chem., 1956, 21, 10, 1186.  
Plapp F. W., Casida J. E. J. Agr. Food. Chem., 1958, 6, 662.  
Pernov K. G. Psychiatr. Neurol. u. med. Psychol., 1961, 13, 11, 416.  
Perry W. L. Ann. Rev. Physiol., 1956, 18, 270.  
Peters R. A. Proc. Roy. Soc. B., 1952, 139, 143.  
Петров Ст., Кръестанов Л. Воен-мед. дело, (Бълг.), 1961, 16, 2, 34.  
Петров Ст., Кръестанов Л. Воен-мед. дело, (Бълг.), 1962, 17, 1, 34.  
Petty C. S. Arch. Path., 1958, 66, 458.  
Pewsnor G. Biochem. J., 1906, 2, 339.  
Platt C. E., Wickers D. D. J. Comp. a. Physiol. Psychol., 1957, 50, 4, 408.  
Pochet A. Ann. Soc. Roy. Sci. med. et natur., Bruxelles, 1955a, 8, 4, 206.  
Pochet A. J. Pharmac. Belg., 1955b, 10, 11—12, 339.  
Polet H., De Schaepfryver A. F. Arch. int. Pharmacodyn., 1959, 118, 1—2, 231.  
Polonovski M. et al. Bull. Soc. chim. Biol., 1953, 35, 3—4, 225.  
Porter G. R. a. oth. Nature, 1958, 182, 927.  
Poziomek E. J. a. oth. J. org. Chem., 1958, 23, 714.  
Poziomek E. J. a. oth. J. org. Chem., 1961, 26, 423.

Po  
Pri  
Pu  
Qu  
Ra  
Ra  
Rat  
Ra  
Re  
Re  
Re  
Re  
Re  
Rev  
Ric  
Ric  
Ric  
Rik  
Rik  
Rin  
  
Rob  
Ros  
Ros  
Ros  
Ros  
Ros h  
Ros  
Rot  
Roy  
Ru b  
Rut  
Rut  
Ryd  
Sac  
Sal  
Sale  
Sall  
San  
Sart  
Sav  
Scal  
Scal  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch  
Sch o

26

Scho  
Schu



- Poziomek E. J. et al. J. Am. Chem. Soc., 1961a, 83, 18, 3916.  
 Pribilla O. Arch. Toxikol., 1955, 15, 210.  
 Pullman B., Valdemoro C. Biochim. biophys. Acta, 1960, 43, 3, 548.  
 Quilliam J. P. Med. Pr. 1947, CCXVIII, 5659.  
 Randall L. O., Jampolsky L. M. Amer. J. Phys. Med., 1953, 32, 102.  
 Randall W. C., Kimura K. K., Pharmacol. Reviews, 1955, 7, 3, 365.  
 Rathus E. M., Bottomecy W. P. Med. J. Australia, 1958, 2, 3, 88—91.  
 Ravina A. Presse méd., 1955, 63, 65, 1329.  
 Rey W. J. a. oth. J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4743.  
 Reardon M. J. a. oth. Fed. Proc., 1947, 6, 364.  
 Reinhold J. G. a. oth. Am. J. Clin. Pathol., 1953, 23, 7, 645.  
 Reitter Experientia, 1957, 13, 7, 296.  
 Rene H., Delga J. C. R. Soc. Biol., 1954, 148, 9—10, 870.  
 Rene H., Delga J. C. R. Soc. Biol., 1955, 149, 11—12, 1106.  
 Revelli U., Grasso E. Minerva med., 1962, 53, 24, 881.  
 Richl J. L., Uuna K. R. Recent advances in biol. psychiatry, 1960, 25, 345.  
 Richter D., Croft P. G. Biochem. J., 1942, 36, 746.  
 Richterich R. Schweiz. med. Wschr., 1962, 92, 9, 263.  
 Riker W. F., Wescoe W. C. J. Pharmacol., 1946, 88, 58.  
 Riker W. F., Wescoe W. C. J. Pharmacol., 1949, 95, 515.  
 Rinaldi F., Himwich H. E. A. M. A. Arch. Neurol. a. Psychiat., 1955, 73, 396.  
 Robinson E. M. a. oth. J. Pharmacology exp. Therap., 1954, 110, 4, 385.  
 Rosenberg P. Biochem. Pharmacol., 1960, 3, 3, 219.  
 Rosenberg P., Coon J. M. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, 97, 836.  
 Rosenberg P., Coon J. M. J. Pharmacol. exp. Ther., 1960, 128, 3, 289.  
 Rosenblueth A., Simeone F. A. Am. J. Physiol., 1938, 122, 708.  
 Rosenzweig M. R., Krecg D. M., Bennet E. L. В кн.: Biological and biochemical bases of behavior. Wisconsin Press, 1958, 367.  
 Rosival L., Selecky V. Pracovni ler., 1955, 7, 6, 335.  
 Rothenberg M. A., Nachmansohn D. J. Biol. Chem., 1947, 168, 223.  
 Roy B. B., Kuperman A. S. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, 89, 255.  
 Rubin L. S., Goldberg N. N. J. Appl. Physiol., 1958, 12, 305.  
 Rutland J. P. Biochem. J., 1957, 66, 3, 43.  
 Rutland J. P. Brit. J. Pharmacol., 1958, 13, 399.  
 Rydon H. N. Nature, 1958, 182, 928.  
 Sacai F., et al. Arch. exp. Path. Pharm., 1952, 234, 210.  
 Salerno P. R., Coon J. M. J. Pharmacol., 1949, 95, 240.  
 Salerno P. R., Coon J. M. Arch. int. Pharmacodyn., 1950, 84, 2—3, 227.  
 Salle J. Arch. int. Pharmacodyn., 1950, 82, 2, 181.  
 Sanger F., Shaw D. C. Nature, 1960, 187, 872.  
 Sartori M. F. Chem. Rev., 1951, 48, 225.  
 Savoldi F., Lanzi G. Boll. soc. ital. biol. sperim., 1960, 36, 24, 1471.  
 Scaife J. F. Canad. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 11 1301.  
 Scaife J. F., Campbell D. H. Nature, 1958, 182, 4651, 1739.  
 Scaife J. F., Schuster J. Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, 38, 10, 1087.  
 Schaefer K. P. Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol., 1955, 226, 6, 505.  
 Schaffer N. K. a. oth. Fed. Proc., 1956, 15, 347.  
 Schaffer N. K. a. oth. J. Biol. Chem., 1957, 225, 197.  
 Schaffer N. K. a. oth. J. Biol. Chem., 1958, 230, 185.  
 Schaumann W. Arch. exper. Pathol. u. Pharmacol., 1959, 236, 2, 415.  
 Schaumann W. Arch. exp. Path., 1960, 239, 81.  
 Schaumann W., Job C. J. Pharmacol., 1958, 123, 114.  
 Scheie H. G. 1949. Цит. по: M. Grant, 1955.  
 Schmir G. L., Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 1173.  
 Schoffeniels E., Nachmansohn D. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 1.  
 Scholz R. O. J. Pharmacol., 1946, 88, 23.  
 Schulman S., Rider J. A., Richter R. B. JAMA, 1953, 152, 18, 1707.



- Schumacher H. *Ophthalmologica*, 1956, 131: 3, 173.  
 Schütz E. *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1886, 21, 341.  
 Schwab R. S., Marshall C. K., Timberlake W. *JAMA*, 1953, 158, 8, 625.  
 Schwab R. S., Osserman K. E., Tether J. E. *JAMA*, 1957, 165, 671.  
 Schweitzer A., Stedman E., Wright S. *Physiol.*, 1939, 96, 302.  
 Schweitzer A., Wright S. *Quart. J. exp. Physiol.*, 1938, 28, 33.  
 Schwert G. W., Neurath H. a. oth. *J. biol. Chem.*, 1948, 172, 221.  
 Scoglund C. R., Cold. Spr. Harb. *Symp. quant. Biol.*, 1952, 17, 233.  
 Scott M. J. *J. Physiol. (Lond.)*, 1957, 139, 489.  
 Scudamore H. H. a. oth. *Blood*, 1951, 6, 1260.  
 Seegers W., Landaburu R. H. *Amer. J. Physiol.*, 1957, 191, 1, 167.  
 Sekul A. A. et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1962, 11, 487.  
 Serlin J., Cotzias G. C. *J. Biol. Chem.*, 1955, 215, 1, 263.  
 Serlin J., Fluke D. J. *J. Biol. Chem.*, 1956, 223, 727.  
 Seume F. W., O'Brien R. D. *J. Agr. Food. Chem.*, 1960, 8, 36.  
 Sheatz G. C. a. oth. *Fed. Proc.*, 1951, 10, 335.  
 Shelly H. *Brit. J. Pharm.*, 1955, 10, 26.  
 Shimazu K. L., Sayers G. J. *Osaka Univ.*, 1954, 1954, 5.  
 Shippley S. S., Binkley F. J. *Biol. Chem.*, 1958, 230, 2, 699.  
 Silver A. *Nature*, 1960, 185, 247.  
 Simon K. *Experientia*, 1962a, 18, 3, 150.  
 Simon K. *Zschr. Naturforsch.*, 1962b, 17b, 6, 371.  
 Sjöstrand T. *J. Physiol.*, 1937, 90, 41.  
 Smith C. M. a. oth. *J. Pharmacol.*, 1952, 105, 391.  
 Smith C. M. a. oth. *J. Pharmacol.*, 1953, 108, 317.  
 Smith R. L. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 3, 384.  
 Sollman T. *A manual of pharmacol.* Philadelphia—London, 1957, 424.  
 Sorm F. et al. *Collect. Czechoslov. chem. Comm.*, 1961, 26, 4, 1048.  
 Spenser T., Sturtevant J. M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 1874.  
 Stadtman E. R., White F. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2022.  
 Stedman E., Stedman E. *Biochem. J.*, 1926, 20, 719.  
 Stedman E., Stedman E. *J. Chem. Soc.*, 1929, 609.  
 Stedman E., Stedman E. *Biochem. J.*, 1935, 29, 2563.  
 Stedman E. a. oth. *Biochem. J.*, 1932, 26, 2056.  
 Stewart J. A., Ouellet L. *Canad. J. Chem.*, 1959, 37, 4, 751.  
 Stewart W. C., McKay D. H. *Canad. J. Biochem. a. Physiol.*, 1961, 39, 6, 1001.  
 Stöhr R. *Die chemische Kampfstoffe*. Berlin, 1961.  
 Stone W. C. *Arch. Ophthalm.*, 1950, 43, 36.  
 Strelitz F. *Biochem. J.*, 1944, 38, 86.  
 Strömblad B. C. *Acta physiol. Scand.*, 1955, 34, 38.  
 Strömblad B. C. *Acta physiol. Scand.*, 1957, 41, 2—3, 118.  
 Stumpf C. *Proc. Western Pharmacol. Soc.*, 1959, 2, 92.  
 Sturge L. M., Whittaker V. P. *Biochem. J.*, 1950, 47, 518.  
 Subbotin V. *Arch. Path. Clin. Med.*, 1869, 6, 285.  
 Sullivan C. L. *West J. Surg. Obstetr. a. Gynec.*, 1958, 66, 3, 161.  
 Sundwall A. *Biochem. Pharmacol.*, 1960, 5, 3, 225.  
 Sundwall A. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 8, 4, 413.  
 Surgenor D. M. a. oth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1223.  
 Surgenor D. M., Ellis D. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 6049.  
 Swann H. E. a. oth. *Amer. Industr. Hyg. Assoc. J.*, 1958, 19, 3, 190.  
 Swensmark O. *Acta physiol. Scand.*, 1961, 52, 267.  
 Swensmark O., Kristensen P. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 67, 3, 441.  
 Tabachnik I. I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 3, 580.  
 Tammelin L. E. *Scand. J. Clin. a. Lab. Invest.*, 1953, 5, 3, 267.  
 Tammelin L. E. *Acta chem. Scand.*, 1957, 11, 8, 1340.  
 Tammelin L. E. *Ark. Kemik.*, 1958a, 12, 3, 287.

Tamm  
 Taver  
 Tazie  
 Thena  
 Thes  
 Thom  
 Thom  
 Thom  
 Tiger  
 Todric  
 Togni  
 Tong  
 Torac  
 Torda  
 Tosch  
 Toshin  
 Tove S  
 Traczy  
 Trautv  
 Trende  
 Turba  
 Tuthil  
 Uchiy  
 Under  
 Unger  
 Uphol  
 Usdin  
 Uvnäs  
 Valdev  
 Vande  
 Varag  
 Varga  
 Varga  
 Varga  
 Varga  
 Veigra  
 Verbe  
 Verbec  
 Vincen  
 Vincen  
 Viswar  
 Viswar  
 Viswa  
 Vojvo  
 Vondr  
 Wagne  
 Wagne  
 Walke  
 Walke  
 Warrin  
 Waser  
 Waterl  
 Webb E  
 Webb  
 Wegma  
 Weil L  
 Weinst  
 Weis S  
 Weller



- Tammelin L. Svensk. kem. tidskr., 19586, 70, 4, 157.  
 Taverner D. Brit. J. Pharmacol., 1954, 9, 84.  
 Tazieff-Depierre F., Martin L. C. R. Acad. Sci., 1962, 254, 20, 3594.  
 Thenard P. C. R. Acad. Sci., 1847, 25, 892.  
 Thesleff S. Цит. по: B. Holmstedt, 1959.  
 Thomas J., Buckley D. J. Pharmacy a. Pharmacol., 1962, 14, 4, 225.  
 Thompson R. S. H. Dsch. med. Mschr., 1957, 82, 41, 1763.  
 Thompson R. S. H., Tronnce J. R. Lancet, 1956, 1, 656.  
 Tigerman B. et al. Trans. Ill. State Acad. Sci., 1956, 48, 108.  
 Todrick A. Brit. J. Pharmacol., 1954, 9, 76.  
 Togni G. P. Schweiz. Arch. Tierheilkunde, 1954, 86, 3, 122.  
 Tong H. S., Way J. L. J. Pharmacol. exp. Therap., 1962, 138, 2, 218.  
 Torack R. M. Exp. Neurol., 1962, 6, 3, 224.  
 Torda C., Wolff H. G. Am. J. Physiol., 1947, 151, 345.  
 Toschi G. Exp. Cell. Res., 1959, 16, 232.  
 Toshiro A. J. Nara med. Assoc., 1960, 11, 1, 60.  
 Tove S. B. Biochim. Biophys. Acta, 1962, 57, 2, 230.  
 Traczyk W. Bull. Acad. polon. sci. Ser. sci. biol., 1959, 7, 10, 421.  
 Trautwein W., Dudel J. Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1958, 266, 324.  
 Trendelenburg P. Arch. ges. exp. Path. Pharm., 1912, 69, 79.  
 Turba F., Gundlach G. Biochem. Zschr., 1955, 327, 186.  
 Tuthill J. W. J. New Engl. J. Med., 1958, 258, 20, 1018.  
 Uchiyama Y. Japan J. Med. Progr., 1959, 46, 1, 40.  
 Underhay E. et al. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 635.  
 Unger M. Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1907, 119, 373.  
 Upholt W. M., Quiby G. E. et al., AMA Arch. Ophthalm., 1956, 56, 128.  
 Usdin V. R. et al. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1961, 108, 2, 457.  
 Uvnäs B. Acta physiol. Scand., 1948, 15, 427.  
 Valdevieso C. L. Med. J. cirugia guovra, 1961, 23, 9, 433.  
 Vandekar M., Heath D. Biochem. J., 1957, 67, 2, 202.  
 Varagio V. Brit. J. Pharmacol. a. Chemotherapy, 1955, 10, 3, 349.  
 Varga E. et al. Acta physiol. Hung., 1954, 5, 3—4, 383.  
 Varga E. et al. Acta physiol. Hung., 1955, 7, 1—2, 171.  
 Varga E. et al. Acta physiol. Hung., 1957a, 11, 3—4, 235.  
 Varga E. et al. Acta physiol. Hung., 1957b, 11, 3—4, 243.  
 Veigra Цит. по: Fevlberg W. Arch. internat. Physiol., 1952, 49, 544.  
 Verbece R. Arch. internat. Pharmacodyn., 1949a, 79, 1.  
 Verbece R. Arch. int. Pharmacodyn., 1949b, 80, 19.  
 Vincent D., Parant M. C. R. Soc. Biol., 1954, 148, 21—22, 1878.  
 Vincent D. et al. C. R. Soc. Biol., 1962, 156, 1, 34.  
 Viswanatha T., Lawson W. B. Arch. Biochem. Biophys., 1961, 93, 1, 28.  
 Viswanatha T., Liener I. E. Biochim. Bophys. Acta, 1960, 37, 3, 389.  
 Viswanatha T., Liener I. E. J. Biol. Chem., 1956, 221, 2, 961.  
 Vojvodic V., Binenfeld Z. Voj. San. Pregl., 1962, 19, 1, 7.  
 Vondracek V. Vojens zdravoth. listy, 1960, 29, 3, 120.  
 Wagner-Jauregg T. et al. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 922.  
 Wagner-Jauregg T., Hackley B. E. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 125.  
 Walker M. W. Lancet, 1934, 1, 1200.  
 Walker M. W. Proc. Roy. Soc. Med., 1935, 28, 6, 759.  
 Warringa M. G. P. J., Cohen J. A. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 300.  
 Waser P. G. J. Pharmacy a. Pharmacol., 1960, 12, 10, 577.  
 Waterlow J. Lancet, 1950, 1, 908.  
 Webb E. C. Biochem. J., 1948, 42, 96.  
 Webb J. L. Brit. J. Pharmacol., 1950, 5, 335.  
 Wegmann R. et al. Ann. Histochem., 1960, 5, 2, 181.  
 Weil L. et al. Arch. Biochem. Biophys., 1953, 46, 226.  
 Weinstein M., Roberts M. JAMA, 1953, 153, 4, 268.  
 Weis S. J. Pharmacol. exp. Ther., 1926, 27, 3.  
 Weller J. M. et al. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1955, 90, 3, 699.



- Werner G., Kuperman A. B. кн.: Heffter Handbuch d. exp. Pharmakol. Ergänzungswerk., 1963, Bd. 15.
- Wescoc W. C., Green R. E., McNamara B. P., Krop S. J. Pharmacol., 1948, 92, 63.
- White R. P. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1956, 93, 1, 113.
- White R. P., Boyajy L. D. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1959, 102, 2, 479.
- White R. P., Himwich H. E. J. Neurophysiol., 1957, 20, 81.
- Whittaker V. P. Physiol. Rev., 1951, 31, 3, 312.
- Wilhelmi G., Domenjoz R. Arch. int. Pharm., 1951, 86, 3, 321.
- Williams D., Russel W. R. Lancet, 1941, 240, 476.
- Williams M. W. a. oth. J. Agr. Food. Chem., 1958, 6, 514.
- Willoughby D. A. Nature, 1961, 189, 4766, 461.
- Wills J. H. U. S. Armed Forces Med. J., 1955, 6, 162.
- Wills J. H. U. S. Armed Forces Med. J., 1955, 6, 9, 1329.
- Wills J. H. U. S. Armed Forces Chem. J., 1957, 11, 2, 24.
- Wills J. H. J. Med. a. Pharmacol. Chem., 1961, 3, 2, 353.
- Wills J. H. В кн.: Heffters Handbuch d. exp. Pharmakol. Ergänzungswerk., 1963, Bd. 15.
- Wills J. H., Somers L. M. J. pharm. exp. Ther., 1956, 117, 1.
- Wilson A., Wilson H. Amer. J. Med., 1955, 19, 697.
- Wilson I. B. J. Biol. Chem., 1951, 190, 111.
- Wilson I. B. J. Biol. Chem., 1952, 197, 215.
- Wilson I. B. Disc. Faraday Soc., 1955, 20, 119.
- Wilson I. B. J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 9, 2383.
- Wilson I. B. Biochem. Biophys. Acta, 1958, 27, 1, 196.
- Wilson I. B. Fed. Proc., 1959, 18, 2, 752.
- Wilson I. B. et al. J. Biol. Chem., 1961, 236, 5, 1498.
- Wilson I. B., Alexander J. J. Biol. Chem., 1962, 237, 4, 1323.
- Wilson I. B., Altamirano M. В кн.: Neurochemistry. Korey S. R. a. Nurnberger J. I., London, 1956, 155.
- Wilson I. B., Bergmann F. J. Biol. Chem., 1950a, 185, 479.
- Wilson I. B., Bermann F. J. Biol. Chem., 1950b, 186, 683.
- Wilson I. B., Bergmann F., Nachmansohn D. J. Biol. Chem., 1950, 186, 781.
- Wilson I. B., Cabib E. J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 20, 5154.
- Wilson I. B., Ginsburg S. Arch. Bioch. Biophys., 1955b, 54, 2, 569.
- Wilson I. B., Ginsburg S. Biochem. Pharmacol., 1958, 1, 200.
- Wilson I. B., Ginsburg S., Quan C. Arch. Biochem., 1958, 77, 286.
- Wilson I. B., Harrison M. A. J. Biol. Chem., 1961, 236, 8, 2292.
- Wilson I. B., Hatch M. A., Ginsburg S. J. Biol. Chem., 1960, 235, 2312.
- Wilson I. B., Levine S., Freiburger J. J. Biol. Chem., 1952, 194, 613.
- Wilson I. B., Meislich E. K. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 18, 4628.
- Wilson I. B., Quan C. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, 1, 131.
- Wilson I. B., Sondheimer F. Arch. Biochem. Biophys., 1957, 69, 468.
- Wilson W. C. Brain, 1934, 57, 422.
- Winter G. D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 87, 2, 629.
- Wirth W. Dtsch. med. Wschr., 1954, 33/34, 1205.
- Woolley D. W. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 1962, 48, 4, 709.
- Wooton J. F., Hess G. P. Nature, 1960, 188, 4752, 726.
- Wooton J. F., Hess G. P. J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 20, 4234.
- Wright P. G. J. Physiol., 1954, 126, 52.
- Yon J. Nucleus, 1962, 3, 204.
- Yung O. Arch. Toxicol., 1957, 16, 341.
- Zajicek J. Acta physiol. Scand., 1957, 40, Suppl., 138.
- Zajicek J., Zeuthen E. Exp. Cell. Res., 1956, 11, 3, 568.
- Zeller E. A., Bissegger A. Helv. chim. Acta, 1943, 26, 1619.
- Zittle C. A. et al. Arch. Biochem. Biophys., 1953, 48, 43.
- Zsigmond E. K. a. oth. J. Neurochem., 1961, 8, 1, 72.



## УКАЗАТЕЛЬ ПРЕПАРАТОВ

- Адреналин 97, 250  
 Акридин 86  
 Алдрин (гексахлоргексагидродиметан-нафталин) 150, 323  
 Алкилфосфаты 326  
 Амбеноний (мителаза, мисуран, оксамезил W: N-8077) 13, 14, 21, 74, 75, 127, 160, 162, 163, 253, 297  
 Амидоамины замещенных уксусных кислот 301  
 Амиды фосфорных кислот 293  
 Амизил 239, 268, 301, 302, 304, 311  
 Аминазин 301, 308, 311  
 п-Аминобензолсульфамид 287  
 Аминоспирты 311  
 — производные 1,3-аминопропанола 301  
 Аминофиллин 327  
 Аналептики 327  
 Аналог табуна фтористый 294  
 Антибиотики 342  
 Апогалантамин 87  
 Апрофен 231, 302, 305, 310  
 Армин 161, 174, 175, 177, 258, 262, 263, 265, 266, 275, 280, 281, 284, 285, 319  
 Арпенал 174, 178, 301, 305  
 Артан 231, 301, 307  
 Атропин 162, 163, 164, 167, 169, 172, 173, 174, 176, 180, 181, 182, 190, 191, 193, 194, 199, 232, 242, 250, 264, 267, 292, 300, 301, 303, 309, 310, 311, 319, 321, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 336, 337, 338, 339, 340  
 АТФ 325  
 Ацетилхолин 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 38, 39, 40, 54, 55, 57, 58, 63, 107, 108, 109, 123, 125, 126, 163, 164, 165, 167, 170, 172, 176, 178, 179, 180, 183, 184, 185, 187, 190, 192, 193, 194, 197, 198, 200, 201, 203, 204, 205, 208, 211, 230, 240, 241, 242, 245, 246, 249, 250, 251, 253, 266, 285, 286, 289, 292, 297, 298, 312, 324, 325  
 Ацетил-β-метилхолин 13, 14, 23, 27, 28  
 Ацетилтиохолин 45  
 Ацетион 152  
 Ацетоксим 134  
 Бал 327  
 Байер-29493 147  
 Барбитураты 323, 328, 342  
 Бензамон 262  
 N-Бензилатропин 309  
 Бензоилхолин 11, 13, 14, 25, 27, 40  
 Бензпиринбромид 258  
 1,5-бис-(N-аллил-N,N-диметил-4-аммоний-фенил)-пентан-3-он дибромид см. 284 с 51 В. W.  
 1,5-бис-(4-аллилдиметиламмоний-фенил)-пентан-3-он бромид 165  
 Бис-(диэтиламино)-фторфосфат 100  
 N,N'-бис-(диэтил-2-хлорбензиламмоний-метил-оксамид-дихлорид) см Амбеноний  
 Бис-(N-метилпиперидиний-N-2-метилкумаринил-5)-кетондийодид см. СТ-3318  
 Бис-[4-оксиминометилпиридиний (1)]-метилловый эфир-дихлорид см. LüH-6  
 1,5-бис-(4-триметиламмоний-фенил)-пентан-3 15  
 Бис-(триэтиламмоний-этил)-изофталатдийодид (IS-337) 13  
 O,O'-бис(N-этилинхолиний-8)-пентаметиленгликолдийодид см. RP-3381  
 Бретилий 192  
 N-Бромацетамид 58  
 Бромелия 129  
 N-Бромсукцинимид 58, 102  
 Бускопан 310  
 Бутираты холина, фенила и индоксила 26  
 Бутирилтиохолин 27



Бутирилхолин 11, 13, 14, 23—27, 29, 184, 297  
 Валерилхолин 11, 27  
 Вещества ганглиоблокирующие 302, 310  
 — деполаризующие 211  
 — курареподобные 211, 302  
 — местноанестезирующие 312  
 Витамины 327  
 Витамин В<sub>1</sub> 87  
 — С 327  
 — Е 87  
 — Р 327  
 Газы нервные 268, 270, 307  
 Галантамин, см. Нивалин  
 Галлацетофеноноксим 134  
 Гамон 90  
 Гд-7 93, 122, 217  
 Гд-42 (метилсульфометилат о-этил-S-β-меркаптоэтилового эфира метилфосфиновой кислоты) 30, 93, 112, 122, 216, 217, 219  
 Гд-107 217  
 Гд-108 217  
 Гексаэтилтетрафосфат (бладан) 95  
 Гексилацетат 27  
 Гексоний 191, 266, 310  
 Гемихолиний 299, 324  
 Гидроксиламин 83, 84, 98, 100, 133, 154  
 Гистамин 178, 287  
 Гистидин 101  
 Глицеризин 327  
 Глюкоза 327  
 Глюкозоксим 134  
 Гомохолин 170  
 Гутион 126, 279  
 ГЭПФ 165  
 ГЭТФ 169  
 ДАМ (диацетилмоноксим) 137, 143, 313—317, 319, 320, 341  
 Дарстин 307  
 ДДФФ 94, 278  
 Декаметоний 205, 208, 314  
 Демекарий (декаметилен-бис-N-метилкарбаминоил-M-триметиламмоний-фенол-тосмилен) см. ВС-48  
 Деметол 213  
 Диазинон 102, 153, 213, 278  
 Диалкилпроизводные хинолина 294  
 Диалкилфосфорилпроизводные аминофенолов 294  
 Диацетилмоноксим 101, 134  
 Дибенамин 192  
 Ди-н-бутилфторфосфат 129  
 11-Дигидро-17-оксикортикостерон-21-ацетат 327  
 Ди-(изопропиламино)-фторфосфат см. Мипафокс

Диизонитрозоацетон 134  
 Диизонитрозоацетилфуран 134  
 Диизопропилфторфосфат (ДФФ) 13, 14, 21, 29, 46, 47, 49, 50, 58, 59, 85, 90, 95, 97, 98, 100, 101, 105—108, 114, 126—130, 141, 144, 145, 147—150, 160, 161, 164, 165, 169—171, 175, 180, 183, 184, 186, 189—191, 194, 195, 197—199, 206, 207, 209, 210, 213, 218, 222, 226, 229, 231, 232, 236, 238—240, 249, 253, 254, 258, 259, 266, 267, 269—271, 274—279, 284—288, 290, 291, 294—297, 303, 306, 307, 309, 312—316, 318, 321, 322, 326, 327, 328, 330, 331, 337, 340  
 Диизопропоксифосфорилтиохолин 294  
 Диметиламид D-лизергиновой кислоты 85  
 Диметиламиноэтанол 138  
 п-(β-диметиламиноэтил)-фениловый эфир диметилкарбаминовой кислоты 77  
 3,3-Диметилбутилацетат 27, 35, 125  
 N,N-диметилкарбамат-(2-окси-5-фенилбензил)-триметиламмоний бромид 176  
 Диметилкарбамилхолин 79, 81, 82  
 Диметилкарбамилфторид 30, 81, 82  
 Диметил- и диэтилфторфосфаты 88  
 Диметоат 149  
 Димефокс 154, 183, 283, 293, 316  
 ДИНА (диизонитрозоацетон) 133, 137, 142, 143, 312, 320  
 Динезин 307, 338  
 Динитрофенол 154, 287  
 2,4-Динитрофторбензол 45  
 Диоксиминоацетон 206  
 3,4-Диоксифенилаланин 97  
 Дипаркол 86, 231  
 α,α-Дипиридил 101  
 Диплацин 211, 212  
 Ди-н-пропил-2,2-дихлорвинилфосфат 106  
 Ди-н-пропилфторфосфат, 126  
 Диптерекс 279, 316  
 Дитилин (диацетилхолин, сукцинилхолин) 86, 209, 211, 297, 314  
 Дитио 258  
 Дитиофос 131, 273, 277, 281, 305  
 Дифазин 174  
 Дифацил см. Спазмолитин  
 2,2-Дихлорвинилдиметилфосфат 152  
 Дифенин 328  
 Дифосфопиридиннуклеотид 153  
 Диэтиламид 2-бром-D-лизергиновой кислоты 85  
 — — D-изолизергиновой 85  
 — — D-лизергиновой см. LSD-25



Диэтиламид кислоты L-лизергиновой 85  
 — — D-1-метиллизергиновой 85  
 Диэтилбис (диметиламидо) пирофос-  
 фат 322  
 Диэтил-п-хлорфенилфосфат 112  
 Диэтилфосфорилтиохолин 121  
 Диэтилфторфосфат 100, 129, 213  
 Диэтоксифосфорилтиохолин 30, 294  
 Зарин 90, 91, 97, 98, 100, 101, 106,  
 120, 121, 125, 134, 142, 143, 144,  
 145, 146, 147, 151, 162, 164, 167,  
 170, 173, 175, 179, 181, 186, 188,  
 189, 190, 191, 206, 209, 210, 213,  
 228, 229, 233, 237, 270, 271, 272,  
 276, 277, 281, 283, 284, 285, 287,  
 297, 300, 303, 304, 306, 307, 310—  
 316, 319, 330, 333, 334  
 Зоман 213, 268.  
 Изатин-β-оксим 134  
 Изоникотинилформальдоксим 137, 138  
 Изонитрозоацетофенон 134, 137  
 Изонитрозодимедон 134  
 Изо-ОМПА 13, 14, 126  
 Изосистокс 93, 175, 216, 310  
 — метилсульфометилат 215  
 Имидазол 46, 98, 100, 101  
 2-(имидазолил-4<sup>1</sup>)-фенилацетат 45  
 Индофенилацетат 63  
 Иприт азотистый 7  
 Иохимбин 192  
 ИЭМ-250 167  
 Йодацетамид 154  
 Йодметилат изоникотинилформальд-  
 оксима 138  
 — никотингидроксамовой кислоты  
 134, 137, 143  
 — никотинилформальдоксима 137  
 — пиридин-2-альдоксима см. 2ПАМ  
 — пиридин-4-альдоксима см. 4ПАМ  
 — фенил-3-пиридил-анти-кетоксима 84  
 Калий 40, 195, 196, 202, 203, 325  
 Каломель 166  
 Кальций хлористый 325  
 Камфара 327  
 Карбамилхолин 82  
 Карбиноламин 142  
 Карболен 336  
 Карбофос 211 242, 268, 273, 277, 278,  
 289, 333  
 Карбохолин 53, 170, 198, 207, 262  
 Квалидил 211, 212  
 Кислота бензгидроксамовая 101, 134,  
 137, 142  
 — бетаингидроксамовая 138  
 — галловая 97  
 — гидроксамовая 299, 315  
 — изоникотингидроксамовая 101, 134  
 — изопроксиметилфосфоиновая 98, 151

Кислота карбаминовая 83  
 — п-метилбензгидроксамовая 134  
 — N-метилпиколиновая 321  
 — N-метилпиридиний-2-карбоновая  
 321  
 — морфолин-D-лизергиновая 85  
 — никотингидроксамовая 101, 137,  
 138, 142, 315  
 — пикотингидроксамовая 133, 134,  
 137, 142  
 — пиридин-2-гидроксамовая 134  
 — салицилгидроксамовая 134  
 — синильная 99, 320, 324  
 — фосдриновая  
 — фуругидроксамовая 134  
 Коралокс 263  
 Кораль 279  
 Магнезия сернокислая 309  
 Магний 153, 325  
 Магнолин 86  
 Малатион 93, 102, 103, 152, 153, 189,  
 213, 279, 280, 308  
 Малатионаза 152  
 Меркаптофос 93, 102, 103, 118, 153,  
 168, 169, 185, 189, 190, 191, 214, 227,  
 228, 241, 243, 244, 270, 271, 281, 303,  
 306, 310, 330, 331, 333, 335.  
 Мерпанит 305  
 Мескалин 239  
 Местинон 264, 265  
 Метадон 87  
 Метамизил 239  
 Метансульфонат 3-оксифенилтриме-  
 тиламмония 84  
 Метансульфонилфторид 84, 85  
 Метасистокс 316  
 Метафос (метилпаратион) 147, 183,  
 289, 306  
 Метгемоглобинообразователи 324  
 Метилглиоксим 134  
 Метил-, диметил- и триметилфосфины  
 87  
 Метиленовый синий 67  
 Метилизопропоксифосфорилтиохолин  
 120  
 Метилкарбамилхолин 81, 82  
 Метилмеркаптофос 247, 281  
 2-метил-1, 4-нафтогидрохиондифос-  
 фат 267  
 Метилпараоксон 118  
 Метилпаратион 102, 117, 147, 310, 337  
 Метилсульфометилат изосистокса 175  
 Метилфосфорил-β-метилхолин 170  
 Метилфторфосфорил-β-метилхолин 143  
 Метилфторфосфорилгомохолин 13, 143,  
 170, 275  
 Метилфторфосфорилкарбохолин 170  
 Метилфторфосфорилхолин 94, 143,  
 209, 210



Метилфосфорилхолин 170  
N-Метилхинолинийдиэтилфосфат 93  
Метилэтилтиофос 287  
Метилэтоксифосфорилтиохолин 13, 94, 126  
Метоксин 305  
Метйодид никотингидроксамовой кислоты 133  
— пиридинальдоксида 326  
Мехолин 170  
МИНА (моноизонитрозоацетон) 101, 133—137, 142, 144, 199, 206, 296, 312—317, 319, 320  
Миотин 78, 80  
Мипафокс 13, 14, 114, 126, 130, 143, 213, 284  
Мисуран см. Амбеноний  
Мителаза см. Амбеноний  
Митолон 309  
Монодрал 301, 304  
Монометилкарбамилхолин 79  
Моноэтиламид 85  
Морин (2, 3, 4, 5, 7-пентаоксифлавон) 299, 324  
Морфин 67, 87, 240, 328  
Мультерган 86  
Мускарин 300  
М-136 (сульфид) 122, 202  
М-137 123  
Натрий 202, 203  
Натрий-5-этил (1, 3-диметилбарбитурат) 229  
Неостигмин см. Прозерин  
Нибуфин (п-нитрофениловый эфир дибутилфосфиновой кислоты) 161, 168, 258, 261  
Нивалин 86, 167, 170, 171, 184, 190, 195, 198, 212, 222, 225, 232, 234, 235, 236, 242, 247, 256, 257, 268  
Никетамид 327  
Никотин 87, 164, 172, 178, 241, 296  
Никотинамид (витамин РР) 327  
Никотинилформальдоксим 137  
Нитрит тиосульфата 320  
п-Нитрофенилацетат 42, 47, 50, 58, 59, 150  
о-Нитрофенилбутират 63  
Новокаин 312, 325  
Норадреналин 342  
N-Окись шрадана 154, 155  
Оксазил 253  
Оксамезил см. Амбеноний  
Оксамиды 309  
17-Оксикортикостероиды 214, 327  
м- и п-Оксибензальдоксиды 134  
Оксиметилдимефокс 155  
Оксиметилшрадан 103, 155, 157  
Оксимы 299, 315, 317, 319  
2-Оксиоксиды 320

3-Оксифенилтриметиламмоний 71  
М-Оксифенилтриметиламмонийбромид 165  
о-Оксиацетофеноноксим 134  
Октаметил (шрадан) 96, 102, 103, 143, 154, 156, 178, 179, 183, 213, 254, 270, 276, 283, 284, 287, 293, 298, 303, 306, 310, 312—314, 316, 322—324, 331  
Октаметилен-бис-(карбаминоил-М-триметиламмонийфенол) 173  
ПАД 318  
2ПАМ см. Пиридин-2-альдоксимметйодид  
4ФПАМ 146  
Папаин 42, 129  
Парамион 212  
Параоксон см. Фосфакол  
Паратион (тиофос) 91, 92, 100, 102, 103, 105, 106, 110, 114, 117, 130, 147, 148, 149, 150, 153—155, 157, 165, 168, 169, 175, 179, 182, 183, 185, 189, 190, 191, 194, 210, 222, 226—229, 232, 237, 241, 244, 271, 272, 273, 276, 278, 281, 283, 286, 287, 288—290, 293, 303—306, 308, 310, 312, 313, 316, 322, 323, 324, 326, 330, 331, 337, 338, 339, 340  
N-парахлорфенил-N-метилкарбамат метаоксифенилтриметиламмония 184  
2ПАС 314, 315, 319—321, 339—341  
Пахикарпин 310  
Пентаметоний 310  
Пентан-2, 3, 4-трион-2, 3-диоксим 134  
Пентафен 174, 195, 199, 242, 292, 301, 302, 306, 311  
Пентилентетразол 239  
Пентобарбитал натрия 341  
Пепсин 51, 58  
Перманганат калия 103  
Пикртоксин 239  
Пилокарпин 164, 172, 258, 262, 312  
Пиридин-2-альдоксимметйодид 30, 101, 133—136, 138, 139, 141, 143, 144, 146, 152, 163, 168, 193, 194, 209, 210, 312—321, 339—341  
Пиридин-3-альдоксимметйодид 134, 142  
Пиридин-4-альдоксимметйодид 134, 136, 138, 142, 146  
Пиродистигмин 81, 82, 84, 169, 249, 253  
Пирогаллальдоксим 134  
Пиролаксон 212  
Пиротенз 167  
Пирофос 95, 166, 175, 206, 227, 256, 262, 273, 275, 284, 285, 300  
Пирофосфат 189  
— тиамин 87  
Питуитрин 328



Потазан 92, 153, 278  
 Пробантин 308  
 Прозамин 265  
 Прозерин (простигмин, неостигмин)  
 32, 33, 53, 77, 79, 80, 82, 84, 160,  
 161, 163, 164, 169, 171, 173—177,  
 184, 187, 190, 193, 195, 197, 198, 199,  
 201, 204, 207, 212, 215, 216, 221, 222,  
 224, 229, 232, 235, 240, 242, 250, 251,  
 252, 254—258, 263—265, 267, 268,  
 279, 291, 297, 299, 312, 322, 325  
 Производные дифенилгликолетов 299,  
 325  
 — кислоты М-диметиламинобензоил-  
 гидроксамовой 315  
 — — пирофосфорной 275  
 — фенотиазина 311  
 — фосфорилхолинов 275, 294, 296,  
 315  
 Промазин 86  
 Пропазинметилсульфат (лизиван) 14  
 Пропилацетат 27  
 Пропионилхолин 11, 14, 23, 27  
 Простигмин см. Прозерин  
 Резерпин 192  
 Салицилальдоксим 134  
 Сероводород 129, 150  
 Серотонин 86  
 Сецерган 86  
 Симпатол 342  
 Систокс см. Меркаптофос  
 Скополамин 180, 301—303  
 Соединения тионовые 293  
 Соли метониевые М-диметиламино-  
 фенолбензоата, ацетата и М-толуа-  
 та 212  
 — натриевые дифенилбутилуксусной  
 кислоты 169  
 Спазмолитин (дифацил) 301, 304, 311  
 Средства наркотические 328, 342  
 — противосудорожные 328  
 — холинолитические 299, 302  
 Стрихнин 67, 87, 221, 239, 240  
 Строфант 327  
 Сукцинилхолин см. Дитилин  
 Сульфамид 287  
 Сульфат аммония 65  
 — магния 325  
 Сульфометилат-3-(диизопропокси-  
 фосфинилокси-N-метилпиридиния)  
 198  
 Табун 90, 91, 97, 99, 101, 125, 143,  
 151, 167, 175, 182, 186, 189, 195, 198,  
 209, 213, 225, 228, 229, 245, 267, 274,  
 275, 303, 307, 324, 326  
 Такрин (1, 2, 3, 4-тетрагидро-5-амино-  
 акридин) 86, 211  
 Твин-20 (полиоксиметиленсорбитан-  
 монолаурат) 66

Тензамин 167  
 Тензилон см. Эдрофоний  
 Теофиллин 328  
 Тестостерон 154  
 Тетрагидроаминоакридин см. Такрин  
 Тетраизопропилпирофосфорамид см.  
 Изо-ОМПА  
 Тетрам 103  
 Тетраметиламмоний 70, 71, 76  
 Тетраметохининметйодид 184  
 Тетра-н-пропилпирофосфат 129  
 Тетраэтиламмоний 71, 178, 199  
 Тетраэтилдитиофосфат 310  
 Тиамин см. Витамин В<sub>1</sub>  
 Тиаминпропилдисульфид 327  
 Тимет 93  
 Тиогликолат 129  
 Тиопентал натрия 328, 341  
 Тиопропазат 86  
 Тиофос см. Паратион 290  
 Тиофосфен 258, 263  
 Тиохолин 63  
 Тирозин 97  
 ТМБ-4 (1, 3-бис-(N-пиридиний-4-альд-  
 оксим)-пропандибромид 139—141,  
 143, 152, 312—316, 318—320  
 Тосмилен 263  
 Тофранил 86  
 Треонин 101  
 Триацетин 24—28  
 Трибутирин 28, 59  
 Триизонитрозопропан 134  
 Триметиламинопропан 38  
 Триметиламмоний 71, 76  
 Триметин 328, 341  
 1, 2, 4-Триоксибензол 97  
 Триортотрезилфосфат (ТОКФ) 96,  
 127, 130, 156, 213, 290  
 Трипсин 41, 47, 48, 52, 58, 85, 106,  
 129  
 Триэтилентиофосфорамид 266  
 Три-(этилфенил)-фосфат 213  
 Тропацин 195, 231, 302, 303, 311  
 α-Тубокурарин 209—212, 302, 309,  
 314  
 ТЭПФ (тетраэтилпирофосфат) 30, 36,  
 57, 58, 91, 94, 95, 97, 101, 106, 114,  
 127, 128, 129, 130, 132, 133, 150,  
 161, 165, 169, 181, 184, 186, 188—191,  
 193, 194, 200, 206, 207, 209, 210, 218,  
 222, 226, 231, 237, 249, 250, 253, 254,  
 256, 270, 275, 285, 287, 302—304,  
 306, 307, 310, 212—316, 318, 322—  
 324, 328, 330, 331  
 Углеводороды хлорированные 299,  
 323  
 Уретан 185  
 Фенадон 87  
 Фенерган 86



Фенилглиоксим 134  
 Фенилметансульфонилфторид 52  
 Фенилтриметиламмоний 71, 76  
 Фенотиазина N-аминоалкилзамещенные 301  
 Физостигмин см. Эзерин  
 Фосарбин см. Пирофос  
 Фосдрин 94, 102, 104, 152, 153  
 Фосфакол 91, 100, 101, 105, 106, 109, 110, 114, 118, 126, 127, 129, 130, 141, 144, 147, 150, 160, 161, 163, 164, 168—170, 175, 177, 181, 193, 194, 200, 205, 206, 210, 218, 222, 227, 229, 244, 256, 260—262, 266, 270, 272, 275, 277, 284, 287, 295—297, 300, 301, 303, 304, 306, 310—316, 318  
 Фосфамид 287  
 Фосфамидон 104  
 Фосфолин см. Экотиофат  
 Фосфорилхолины 218, 254, 268, 270, 297  
 Фторметилфосфинилгомохолин 121, 126  
 Фторметилфосфинилхолин 120  
 Фурамон 262  
 8-Хинолилдиетилтиофосфат 105  
 О-Хлорбензальдоксим 134  
 Хлоргидрат пиколингидроксамовой кислоты 133  
 Хлордан 323  
 п-Хлормеркурибензоат 129, 150  
 Хлормеркуринитрат 150  
 Хлорпикрин 154  
 Хлорпромазин (аминазин) 86  
 Хлортион 189, 243, 278  
 N-Хлорфенил-N-метилкарбамат 165  
 N-п-Хлорфенил-N-метилкарбамат-M-оксифенил триметиламмоний хлорид 176  
 Холин 12, 38, 40, 53, 55, 70, 71, 108, 138, 139, 197, 207, 298  
 Холинэстераза очищенная 299, 325  
 Цианиды 320  
 Циклогексан-1, 2-диондиоксим 134  
 Шрадан см. Октаметил  
 Ш-68 216  
 Ш-69 216  
 Эдрофоний (тензилон) 72, 207, 212  
 ЭДТА 327  
 Эзерин (физостигмин) 32, 33, 34, 53, 76, 77, 80, 82, 84, 127, 159, 160, 161—165, 167—169, 171, 172, 175, 178, 180, 183—186, 188, 190, 192—195, 197—199, 201, 205, 207, 208, 212, 215, 216, 220—223, 229, 231, 232, 234, 235, 238—242, 246—253, 255, 257—259, 262, 264, 266—268, 278, 287, 290, 291, 297, 300, 312, 321, 322, 325, 328, 329

Экотиофат (фосфолин) 160, 162, 163, 182, 186, 321, 322  
 Эндотион 210  
 Эстрадиол 327  
 Этил-бис-(диэтилфосфорил)-амид (А-1) 95  
 Этилзарин 213  
 s-(β-Этилмеркаптоэтил-диэтилтиофосфинат см. Ш-68  
 Этил-р-нитрофенилтионобензолфосфат 278  
 Этропазин 15  
 Эфир метилкарбаминовый фенола 77  
 — метиловый п-толуолсульфониларгинина 129  
 — этиловый пирофосфорной кислоты 88  
 Эфиры аминокислот замещенных гликолевых 301  
 — — — уксусных 301  
 — — — циклоалканкарбоновых 301  
 — дихолиновые амида дикарбоновых кислот 211  
 — кислот дибутилфосфиновых 266  
 — — дипропилфосфиновых 266  
 — скопина 301  
 — тропина 301, 311  
 — этилфосфиновой кислоты 294  
 ЭФН 153, 213, 279, 280, 327  
 ВС-18 173  
 ВС-40 (гексаметилен-бис-(N-метилкарбаминоил-M-триметиламмоний) 253, 265  
 ВС-47 83, 265  
 ВС-48 79, 80, 83, 263, 265, 363  
 СТ-3318 13, 14  
 Е-838 218  
 G-3063 307  
 НС-3 324  
 IS-306 14  
 LSD-85  
 LüH-6 141  
 Nu-683 [диметилкарбамат-(2-гидроксип-5-фенилбензил)-триметиламмоний-бромид] 14, 81, 82, 184, 196  
 Nu-1197 81  
 Nu-1250 79, 80, 82  
 Ro3-0422 (N-метилхинолинийдиэтилфосфат) 119  
 Ro3-0412 310  
 RP-3381 13, 14  
 RSO<sub>2</sub>F 85  
 SKF-525A (β-диэтиламиноэтиловый эфир дифенилпропилуксусной кислоты) 152, 155, 299, 323  
 S-108 (дийодметилат-N-диэтиламино-N-пирролидинэтилового эфира) 266  
 WiN-8077 (амбеноний, мителаза, ми-



суран) см. Амбеноний

WIN-2299 304

WIN-3413 306

WIN-5779-6 306

11 259

74 310

131 265

132 265

217AO 182, 210, 288

217MY 198, 210

277AO 198

284 с 51 В. W. 14, 19, 73

302is 74, 75

306is 75

307 (диметиловый эфир  $\alpha$ -ацетокси-

$\beta, \beta, \beta$ -трихлорэтилфосфиновой кис-  
лоты) 266

309 С (диметилкарбамат-М-оксифенил-  
диэтилметиламмоний метилсульфат)  
171

2840 [диметобромид-1,5-ди-(п-Н-ал-  
лил-Н-метил-аминофенил)-пентан-  
3-он] 196

3113СТ 78, 80

3116СТ 73, 76, 78

3152СТ 78

3220СТ 75

3318СТ 75

3381RP 74

3443СТ 76



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
-----------------------	---

### ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

Холинэстеразы . . . . .	5
Общие представления о механизме передачи нервных импульсов в си- напсах и роль холинэстеразы . . . . .	—
Общие свойства холинэстераз . . . . .	12
Открытие, номенклатура и классификация холинэстераз . . . . .	—
Распространение холинэстераз . . . . .	15
Субстратная специфичность . . . . .	22
Каталитическая эффективность . . . . .	28
Строение активной поверхности холинэстеразы и механизм гидролиза ацетилхолина . . . . .	31
Двойственная природа активной поверхности холинэстеразы . . . . .	32
Гидролиз ацетилхолина . . . . .	39
Эстеразный центр . . . . .	41
Участие имидазола в эстеразном центре . . . . .	43
Участие серина в эстеразном центре . . . . .	47
Объединенная схема эстеразного катализа . . . . .	51
Участие фенольных и других групп в каталитическом действии эсте- раз . . . . .	56
Анионный центр . . . . .	60
Методы определения и изолирования холинэстераз . . . . .	61
Методы определения активности холинэстеразы . . . . .	—
Очистка холинэстеразы . . . . .	65

### ЧАСТЬ ВТОРАЯ

Антихолинэстеразные вещества . . . . .	67
«Обратимые» ангибиторы холинэстеразы . . . . .	70
Четвертичные аммониевые соединения . . . . .	—
Эфиры карбаминовой кислоты . . . . .	76
Механизм действия карбаматов на холинэстеразу . . . . .	82
Другие ингибиторы . . . . .	85
Фосфорорганические соединения . . . . .	87
Открытие и значение фосфорорганических соединений . . . . .	—
Строение и общая характеристика . . . . .	89
Обзор химических свойств . . . . .	96
Фосфорилирование . . . . .	97
Гидролиз . . . . .	99
Окисление . . . . .	102
Изомеризация . . . . .	103
Самоалкилирование . . . . .	104



Действие фосфорорганических соединений на ферменты . . . . .	105
Действие на холинэстеразу . . . . .	—
Кинетика торможения холинэстеразы и способ выражения анти- холинэстеразной активности ФОС . . . . .	111
Зависимость между структурой ФОС и их антихолинэстеразной активностью . . . . .	114
Фосфорилирующая способность . . . . .	119
Способность к ориентации . . . . .	125
Значение оптической изомерии . . . . .	126
Действие на разные холинэстеразы . . . . .	—
Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС . . . . .	127
Действие на другие ферменты . . . . .	131
Реактивирование холинэстеразы, угнетенной ФОС . . . . .	—
Спонтанная реактивация . . . . .	133
Восстановление активности с помощью реактиваторов . . . . .	135
Кинетика и механизм реактивации . . . . .	136
Строение реактиваторов . . . . .	141
О гипотезе «молекулярной комплементарности» . . . . .	142
Зависимость реактивации от природы ингибитора и фермента . . . . .	143
Утрата способности к реактивации . . . . .	146
Превращения фосфорорганических соединений в организме . . . . .	—
Распределение и выведение ФОС . . . . .	149
Детоксикация ФОС . . . . .	153
Активация ФОС . . . . .	157
Фармакология антихолинэстеразных веществ . . . . .	159
Влияние антихолинэстеразных веществ на органы и системы . . . . .	—
Влияние на глаз . . . . .	163
Влияние на желудочно-кишечный тракт . . . . .	—
Влияние на пищеварительные железы . . . . .	166
Влияние на двигательную функцию желудочно-кишечного тракта . . . . .	172
Влияние на некоторые железы . . . . .	173
Влияние на сократительную деятельность матки . . . . .	175
Действие на систему дыхания . . . . .	—
Бронхоспазм . . . . .	180
Действие на дыхательный центр . . . . .	183
Влияние на хеморецепторы каротидных клубочков . . . . .	185
Влияние на дыхательную мускулатуру . . . . .	188
Действие на сердечно-сосудистую систему . . . . .	—
Изменения кровяного давления . . . . .	—
Гипотензивные эффекты . . . . .	190
Гипертензивные эффекты . . . . .	192
Действие на сердце . . . . .	194
Изменения электрокардиограммы . . . . .	197
Действие на ганглии . . . . .	200
Влияние на нервно-мышечные синапсы . . . . .	208
Антикурарное действие . . . . .	213
Мышечные параличи . . . . .	214
Влияние на нейро-эндокринную регуляцию . . . . .	215
Влияние на центральную нервную систему . . . . .	—
Проникновение через гемато-энцефалический барьер . . . . .	220
Влияние на рефлекторную деятельность спинного мозга . . . . .	221
Действие эзерина и прозерина . . . . .	222
Действие ФОС . . . . .	231
Влияние на лабиринтные рефлексы и рефлексы положения тела . . . . .	232
Влияние на электрическую активность мозга . . . . .	239
Влияние на эффекты судорожных и наркотических ядов . . . . .	240
Влияние на высшую нервную деятельность . . . . .	248
Эффекты при непосредственном введении в мозг . . . . .	251
Клиническое применение антихолинэстеразных веществ . . . . .	251



Применение в невропатологии . . . . .	252
Лечение миастении . . . . .	—
Лечение других нервных заболеваний . . . . .	254
Применение при атонии кишечника и мочевого пузыря . . . . .	257
Применение в офтальмологии . . . . .	258
Применение в акушерской практике . . . . .	263
Другие возможности клинического применения . . . . .	265
Токсикология фосфорорганических веществ . . . . .	268
Инттоксикация ФОС у животных . . . . .	—
Симптомы отравления . . . . .	269
Ингаляционное отравление . . . . .	270
Накожная аппликация . . . . .	271
Отравление при попадании яда в желудок . . . . .	273
Зависимость токсичности от химического строения ФОС . . . . .	—
Хроническая интоксикация . . . . .	275
Видовая чувствительность животных к ФОС . . . . .	277
Половые различия в чувствительности к ФОС . . . . .	278
Влияние возраста на токсичность . . . . .	—
Влияние некоторых факторов внешней среды на токсичность ФОС . . . . .	279
Усиление токсичности ФОС при совместном применении . . . . .	—
Токсичность при повторных введениях . . . . .	280
Явления адаптации . . . . .	281
Биохимические изменения при отравлении ФОС . . . . .	282
Угнетение холинэстеразы . . . . .	—
Другие изменения . . . . .	286
Патоморфологические изменения . . . . .	288
Общие представления о механизме действия ФОС . . . . .	290
Экспериментальная терапия отравлений ФОС . . . . .	299
Блокирование холинореактивных систем . . . . .	300
Комбинирование холинолитических веществ . . . . .	302
Комбинирование атропина с курареподобными веществами . . . . .	—
Комбинирование атропина с сернокислой магнезией . . . . .	309
Комбинирование атропина с ганглиоблокаторами . . . . .	310
Комбинирование атропина с М-холинолитиками . . . . .	311
Комбинирование атропина с местноанестезирующими веществами . . . . .	312
Реактивирование холинэстеразы . . . . .	—
Защита холинэстеразы от необратимого угнетения ФОС . . . . .	321
Ускорение гидролиза ФОС . . . . .	323
Подавление синтеза ацетилхолина . . . . .	324
Возмещение холинэстеразы . . . . .	325
Другие виды патогенетической терапии . . . . .	326
Клиника, диагностика и терапия отравлений людей ФОС . . . . .	328
Клиническая картина интоксикации ФОС . . . . .	329
Острое отравление . . . . .	—
Хроническая интоксикация . . . . .	334
Лечение отравлений ФОС . . . . .	336
Прекращение дальнейшего поступления яда в организм . . . . .	—
Антидотная терапия . . . . .	—
Атропинизация . . . . .	—
Применение реактиваторов холинэстеразы . . . . .	339
Искусственное дыхание . . . . .	341
Литература . . . . .	343
Указатель препаратов . . . . .	373



272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
286  
288  
290  
299  
300  
302  
309  
310  
311  
312  
321  
323  
324  
325  
326  
328  
329  
334  
336  
339  
341  
343  
373

ь ФОС

ами

веще



СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ ГОЛИКОВ,  
ВИКТОР ИОСИФОВИЧ РОЗЕНГАРТ

**Холинэстеразы и антихолинэстеразные  
вещества**

Редактор *С. И. Локтионов*  
Техн. редактор *Т. И. Бугрова*  
Корректоры *А. Ф. Шепелева*  
и *А. А. Большаков*

Переплет художника *Д. А. Андреева*

---

Сдано в набор 22/IV 1964 г. Подписано к печати 27/VIII 1964 г.  
Формат бумаги 60×90<sup>1/16</sup>. Бум. л. 12+<sup>1/16</sup> бум. л. вкл.  
Печ. л. 24+<sup>1/8</sup> печ. л. вкл. Учетно-изд. л. 25,7 ЛН-79.  
Тираж 2700 экз. Заказ 363 М-31297 Цена 1 р. 52 коп.

---

Издательство «Медицина». Ленинградское отделение.  
Ленинград, Д-104, ул. Некрасова, д. 10

Ленинградская типография № 2 имени  
Евгении Соколовой «Главполиграфпрома»  
Государственного комитета Совета Министров СССР  
по печати. Измайловский проспект, 29.



зные

28a

VIII 1964 г.  
ум. л. вкл.  
ЛН-79.  
р. 52 коп.

еление.

и  
а»  
ов СССР  
9.



10.52.10

ЛЕВЕНТНА · 1964



ХОАМНЭСТЕРАЗЫ И АНТИХОАМНЭСТЕРАЗНЫЕ ВЕЩЕСТВА